

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

**L'EXPRESSION DE LA PROTÉINE L-ISOASPARTATE
MÉTHYLTRANSFÉRASE EST MODULÉE PAR LA GLYCOGÈNE SYNTHASE
KINASE-3 DANS LES GLIOBLASTOMES HUMAINS**

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
MÉLANIE LAMARRE

JANVIER 2007

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier le Dr Richard Desrosiers, mon directeur de recherche, pour son enthousiasme face à la science, qu'il sait si bien transmettre, sa patience, ses encouragements ainsi que son sens de l'humour qui m'ont servi d'inspiration au cours de ma maîtrise.

J'aimerais aussi remercier mon collègue de laboratoire Irvens Fanélus pour ses conseils techniques.

Je remercie également tous les membres de ma famille et mes amis qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de mes études, ainsi que mon copain Sébastien pour sa compréhension et son soutien moral.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	vi
RÉSUMÉ.....	vii

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 <i>La protéine L-isoaspartate/D-aspartate méthyltransférase</i>	
1.1.1 Histoire et caractéristiques de la PIMT.....	1
1.1.2 Formation des protéines endommagées et réparation par la PIMT.....	4
1.1.3 Rôles et implications biologiques de la PIMT.....	7
1.2 <i>La glycogène synthase kinase- 3</i>	
1.2.1 Les propriétés de GSK-3.....	9
1.2.2 Voies de signalisation impliquant GSK-3.....	12
1.2.3 Implications biologiques de GSK-3.....	15
1.3 <i>Objectifs de la recherche</i>	17

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 <i>Matériel</i>	18
2.2 <i>Méthodes</i>	
2.2.1 Culture cellulaire.....	18
2.2.2 Traitements des cellules avec différents inhibiteurs.....	19
2.2.3 Transfection des cellules avec un siRNA contre GSK-3 α/β	19
2.2.4 Lyse cellulaire.....	19
2.2.5 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide et immunobuvardage de type Western	20
2.2.6 Immunodétection des protéines.....	21
2.2.7 Analyse de l'ARN par RT-PCR.....	21
2.2.8 Analyses statistiques.....	22

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1	<i>Le traitement des cellules U-87 avec une dose thérapeutique de lithium induit l'expression de la PIMT.....</i>	23
3.2	<i>Effets du myo-inositol et de l'acide valproïque sur l'expression de la PIMT.....</i>	24
3.3	<i>L'inhibition de GSK-3 stimule l'expression de la PIMT.....</i>	25
3.4	<i>La phosphorylation de GSK-3 sur la sérine 9 est associée à l'augmentation de l'expression de la PIMT.....</i>	26
3.5	<i>L'augmentation de l'expression de la PIMT par les inhibiteurs de GSK-3 est associée à une augmentation de son ARNm ainsi qu'une augmentation de sa synthèse.....</i>	26
3.6	<i>Les voies de PKA, PKC et Akt, impliquant GSK-3, ne semblent pas influencer l'expression de la PIMT.....</i>	27

CHAPITRE IV

DISCUSSION.....	35
-----------------	----

CONCLUSION.....	42
-----------------	----

BIBLIOGRAPHIE.....	43
--------------------	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Mécanismes de formation de résidus isoaspartates provenant des acides aminés asparagines ou aspartates des protéines.....	4
Figure 1.2	Configuration des résidus aspartates reconnus ou non par la PIMT.....	5
Figure 1.3	Mécanisme de réparation des protéines par la PIMT.....	6
Figure 1.4	Représentation des isoformes α et β de la protéine GSK-3.....	9
Figure 1.5	Régulation de l'activité de GSK-3 β par la phosphorylation de la Ser9.....	11
Figure 1.6	Substrats de GSK-3.....	12
Figure 1.7	Voies de signalisation impliquant GSK-3.....	14
Figure 1.8	Mécanismes d'inhibition de GSK-3 par le lithium.....	16
Figure 3.1	Cinétique de l'expression de la PIMT en présence d'une concentration thérapeutique de lithium.....	29
Figure 3.2	Effets du myo-inositol et de l'acide valproïque sur l'expression de la PIMT.....	30
Figure 3.3	L'inhibition de GSK-3 stimule l'expression de la PIMT.....	31
Figure 3.4	La phosphorylation de GSK-3 sur la sérine 9 est associée à l'augmentation de l'expression de la PIMT.....	32
Figure 3.5	L'augmentation de l'expression de la PIMT par les inhibiteurs de GSK-3 est associée avec une quantité accrue de son ARNm ainsi qu'une augmentation de sa synthèse.....	33
Figure 3.6	Les voies de PKA, PKC et Akt, impliquant GSK-3, ne semblent pas influencer l'expression de la PIMT.....	34

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
Akt	Protéine kinase B
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
APS	Persulfate d'ammonium
ARN	Acide ribonucléique
BSA	Albumine sérique bovine
CDK-1	Cyclin-dependent kinase-1
Chx	Cycloheximide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
Dsh	<i>Dishevelled</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
eIF2B	<i>Eucaryotic initiation factor 2B</i>
FRAT	<i>Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas</i>
GS	Glycogène synthase
GSK-3	Glycogène synthase kinase-3
kDa	kiloDalton
LiCl	Chlorure de lithium
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAPK AP-K1	<i>Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 1</i>
MARK2	<i>Microtubule affinity-regulating kinase 2</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
pb	Paire de bases
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIMT	Protéine L-isoaspartate (D-aspartate) méthyltransférase
PKA	Protéine kinase A
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PVDF	Poly(fluorure de vinylidène)
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
S6K1	S6 kinase 1
SAM	S-adénosyl-L-méthionine
SAH	S-adénosyl-L-homocystéine
SB-216763	3-(2,4-Dichlorophenyl)-4-(1-méthyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione
SB-415286	3-[(3-Chloro-4-hydroxyphenyl)amino]-4-(2-nitrophenyl)-1H-pyrrole-2,5-dione
SDS	Sodium dodécyl sulfate
siRNA	<i>Small interfering ribonucleic acid</i>
TBS	Tampon Tris salin
TCF/LEF	<i>T-Cell factor/Lymphoid enhancer factor</i>
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
VPA	Acide valproïque

RÉSUMÉ

Avec le vieillissement, les protéines accumulent des dommages qui affectent leur structure et activité. La protéine L-isoaspartate (D-aspartate) méthyltransférase (PIMT) est impliquée dans la réparation de protéines endommagées au niveau de résidus aspartates. Bien que son mécanisme d'action soit connu, les voies de régulation qui influencent l'expression de la PIMT ne sont pas très bien établies. Dans cette étude, il a été observé que la protéine nommée glycogène synthase kinase 3 (GSK-3) est impliquée dans la régulation de la PIMT. En effet, le traitement de cellules gliales, devenues cancéreuses, par différents inhibiteurs connus de GSK-3, dont le lithium, a démontré une augmentation de l'expression de la PIMT. Dans la littérature, il a été rapporté que le lithium possède deux cibles principales dans la cellule : la voie de l'inositol et la protéine GSK-3. Cette dernière kinase est notamment contrôlée par la voie de Wnt. Or, le traitement des cellules avec le myo-inositol n'influence pas la PIMT, ce qui exclut la voie de l'inositol comme voie de régulation de la PIMT. Les résultats obtenus en présence de lithium suggèrent cependant une régulation de la PIMT par GSK-3, par l'intermédiaire de la voie de Wnt. Par ailleurs, un traitement des cellules avec différents inhibiteurs de protéines kinases, pouvant agir sur GSK-3 ne semble pas affecter l'expression de la PIMT. Cependant, un traitement des cellules avec un inhibiteur de la synthèse protéique, en présence de lithium, empêche l'augmentation de l'expression de la PIMT, ce qui suggère une régulation au niveau de sa synthèse. De plus, une analyse par RT-PCR démontre une modulation du niveau d'ARNm de la PIMT en présence de différents inhibiteurs de GSK-3. L'établissement de nouvelles voies de régulation pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans des maladies impliquant la PIMT, telle que dans l'épilepsie, l'Alzheimer et surtout dans les états maniaco-dépressifs.

Mots clés : PIMT, GSK-3, lithium, cellules gliales cancéreuses.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 La protéine L-isoaspartate/D-aspartate méthyltransférase

1.1.1 Histoire et caractéristiques de la PIMT

Au cours du vieillissement, les protéines subissent de nombreuses modifications qui s'accumulent alors dans les cellules. Cette accumulation de protéines endommagées crée des déséquilibres biologiques qui sont responsables de différents problèmes de santé. Pour pallier à ce problème, il existe plusieurs classes de protéines de réparation, dont la protéine carboxyle méthyltransférase, qui a pour principale fonction de transférer un groupement méthyle sur des groupements carboxyles de protéines endommagées (Boivin, Bilodeau et Béliveau, 1995). La protéine L-isoaspartate (D-aspartate) méthyltransférase (PIMT) est une enzyme qui, comme son nom l'indique, permet le transfert d'un groupement méthyle, provenant de la S-adenosyl-L-méthionine (SAM), sur un groupement α -carboxyle d'un résidu L-isoaspartate anormal d'une protéine (Aswad, 1995).

C'est en 1965 qu'Axelrod et Daly découvrirent, dans des extraits d'hypophyse, le précurseur de la PIMT, qu'ils nommèrent alors « enzyme formant du méthanol ». Ce qu'ils découvrirent plus précisément c'était la formation de méthanol radioactif lors de l'ajout de S-adenosyl-L-méthionine radioactive aux extraits d'hypophyse, sans toutefois se douter que ce processus impliquait la méthylation des protéines comme étape intermédiaire (Axelrod et Daly, 1965). En 1967, le groupe de Liss a rapporté que la méthylation de l'ovalbumine et de l'albumine sérique humaine était dépendante de la SAM (Liss et Edelstein, 1967). Ce même groupe a décrit, dans une publication subséquente, la purification partielle d'une enzyme de méthylation, provenant d'une rate de rat (Liss, Maxam et Cuprak, 1969), sans jamais faire de rapprochement avec les travaux d'Axelrod et de Daly. Dans le même ordre d'idées, en 1970, Kim et Paik rapportèrent la purification, à partir de thymus de rat, d'une enzyme de méthylation qui était dépendante de la SAM, qu'ils nommèrent protéine méthylase II (Kim et Paik, 1970). Il a été démontré que cette méthylase II modifiait un bon nombre de protéines mais avec

différents degrés d'efficacité. De plus, l'hydrolyse des protéines méthylées avec le ^{14}C menait à la formation de méthanol radioactif, ce qui suggérait que cette méthylase II était la même enzyme qu'étudiait le groupe de Liss (Aswad, 1995). C'est en 1973 qu'un consensus a été établi pour dire que l'enzyme étudiée par le groupe de Liss et la méthylase II de Kim et Paik était la même enzyme que celle qui fut découverte par Axelrod et Daly. Au cours de l'année suivante, Diliberto et Axelrod ont confirmé la présence d'une activité carboxyle méthyltransférase au niveau de l'hypophyse et ont démontré que de nombreuses hormones hypophysaires étaient de bien meilleurs accepteurs de groupements méthyles que l'était l'ovalbumine (Diliberto et Axelrod, 1974).

Au cours de la décennie qui suivit, plus de 60 articles concernant les propriétés et les fonctions de la protéine carboxyle méthyltransférase ont été publiés. Des rôles dans le relargage de vésicules, dans l'entreposage d'hormones, dans l'activité de la calmoduline et dans la chimotaxie des bactéries ont été suggérés pour cette protéine. À un moment, certains chercheurs ont même suggéré que la protéine carboxyle méthyltransférase pouvait avoir un rôle de régulation, un peu comme les protéines de phosphorylation (Aswad, 1995). Bref, les années passèrent sans que quiconque ne parvienne à identifier clairement les fonctions de cette protéine. En 1984, Murray et Clarke parvinrent à identifier que la protéine carboxyle méthyltransférase méthylait sélectivement les résidus L-isoaspartates de l'adénocorticotropine désamidée (Murray et Clarke, 1984). Ainsi, plus les années passèrent, plus la spécificité de cette protéine carboxyle méthyltransférase se précisait. En 1992, Clarke et Lowenson ont démontré que cette protéine pouvait également méthyliser les résidus D-aspartates mais avec une efficacité de 1 500 à 20 000 fois inférieure aux résidus L-isoaspartates (Lowenson et Clarke, 1992). C'est donc à partir de ce moment que la protéine prit le nom de « protéine L-isoaspartate (D-aspartate) méthyltransférase » ou PIMT.

Le gène de la PIMT code pour une protéine d'environ 24 500 daltons qui se retrouve dans la plupart des organismes vivants. En effet, il a été rapporté que la PIMT est présente chez les bactéries, les champignons, les plantes et les animaux (Barten et O'Dea, 1990). Par ailleurs, en plus de se retrouver dans quatre des cinq règnes du monde vivant, la PIMT est exprimée dans de nombreux tissus. C'est dans le cerveau que le niveau de la

PIMT est le plus élevé, suivi de près par les testicules (Aswad, 1995). Toutefois, la PIMT a pu être purifiée à partir d'autres organes dont le thymus (Kim, 1973), les érythrocytes (Kim, Choi et Jun, 1983) et le rein (Gingras, Ménard et Béliveau, 1991). Le fractionnement de ces divers organes a permis de constater que la PIMT se retrouve en majorité dans le cytosol. Cependant, des études ont permis d'identifier la PIMT au niveau des membranes du cerveau (Sellinger *et al*, 1988) et du rein (Boivin, Gingras et Béliveau, 1993) ainsi qu'au niveau du noyau, chez la plante *Arabidopsis* (Xu *et al*, 2004).

Chez l'humain, il existe deux isoformes de la PIMT, désignées isoforme de type I et de type II. Ces deux isoformes semblent provenir d'un épissage alternatif du gène de la PIMT, situé sur le chromosome 6, qui aboutit à une différence de séquence au niveau de la région C-terminale de la protéine (Clarke, 2003), la séquence finale de l'isoforme I étant RWK (299 p.b) et de l'isoforme II RDEL (346 p.b.). Comme la séquence C-terminale de l'isoforme II s'apparente fortement au signal de rétention du réticulum endoplasmique, qui est KDEL, il serait logique de retrouver la PIMT à ce niveau (Potter *et al*, 1992). Toutefois, aucune activité de méthylation par la PIMT n'a été rapportée de manière significative, jusqu'à présent, au niveau du réticulum endoplasmique. Puisque les deux isoformes diffèrent par leur séquence en acides aminés, chacune d'elles possède également un point isoélectrique qui leur est propre, soit de 6,5 pour l'isoforme de type I et 5,5 pour l'isoforme de type II (Aswad, 1995; Lanthier *et al*, 2002). Bien que ces deux isoformes se distinguent par quelques caractéristiques, aucune fonction distincte ne leur a été associée jusqu'à présent. Il semblerait qu'il existe une troisième isoforme de la PIMT, dont le point isoélectrique se situerait à mi-chemin entre les deux isoformes précédentes. Cependant, cette troisième isoforme semble beaucoup moins abondante et n'a pas encore été bien caractérisée (MacLaren, Kagan et Clarke, 1992).

En plus d'avoir différentes isoformes, la PIMT possède également un polymorphisme qui lui procure une certaine diversité. Ce polymorphisme se situe à la surface d'une poche hydrophobe, à l'opposé du site actif, sur l'acide aminé 119 (Clarke, 2003). Ce dernier peut être soit une isoleucine ou une valine. Les polymorphismes ont été étudiés dans des érythrocytes à partir desquels il a été démontré que lorsque la protéine portait une isoleucine en position 119, cela lui conférait une meilleure thermostabilité, tandis que la valine en position 119 lui procurait une meilleure affinité pour les protéines endommagées (DeVry et Clarke, 1999).

1.1.2 Formation des protéines endommagées et réparation par la PIMT

Les protéines peuvent être altérées par différentes modifications post-traductionnelles comme le clivage des chaînes, la désamidation, la glycosylation, l'oxydation et la phosphorylation. Ces différentes modifications des protéines créent souvent un changement conformationnel qui peut aboutir à une altération dans la fonction de la protéine (Robinson et Robinson, 2004). La désamidation des asparagines et l'isomérisation des acides aspartiques sont de bons exemples de modifications non enzymatiques qui affectent les fonctions des protéines, en formant des résidus L-isoaspartates anormaux. Ces processus sont très fréquents et surviennent spontanément à l'intérieur des cellules. Toutefois, des facteurs tels que la température et le pH environnant, ainsi que la structure et le temps de demi-vie de la protéine cible peuvent influencer ces processus.

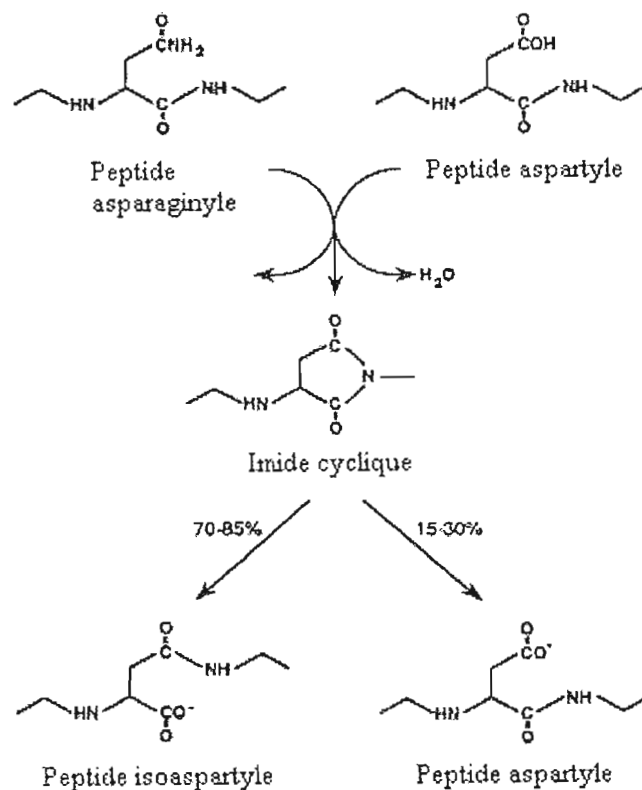


Figure 1.1 Mécanismes de formation de résidus isoaspartates provenant des acides aminés asparagines ou aspartates des protéines (Tirée de Aswad, Paranandi et Schurter, 2000).

Dans le processus de désamidation, la structure primaire de la protéine joue un rôle primordial. En effet, les protéines qui sont le plus susceptibles de subir cette modification sont les protéines possédant une asparagine suivie d'une glycine ou d'un petit acide aminé hydrophobe (Clarke, 2003). La désamidation est initiée par une attaque nucléophile de l'azote du lien peptidique sur le groupe carbonyle de la chaîne latérale de l'asparagine (Figure 1.1). Ce processus va mener à la formation d'un intermédiaire cyclique, le succinimide. Cet intermédiaire peut également être formé par la déshydratation d'un aspartate dans une protéine. Le succinimide ainsi formé est instable et est alors hydrolysé pour former soit un résidu isoaspartate anormal ou un résidu aspartate, dans un ratio d'environ 3 : 1 (Weintraub et Manson, 2004).

La formation spontanée de résidus L-isoaspartates n'est pas dommageable pour la cellule. C'est plutôt l'accumulation, au cours du vieillissement, de ces protéines endommagées, qui peut causer des dérèglements cellulaires. C'est le cas notamment dans certaines maladies, dont l'Alzheimer (Clarke, 2003). Dès lors, la PIMT devient essentielle dans la cellule, en permettant la réparation des résidus L-isoaspartates. En effet, la PIMT a la capacité de reconnaître les résidus L-isoaspartates et D-aspartates et de les réparer. Toutefois, elle ne possède pas une très grande affinité pour les résidus D-aspartates. De plus, les résidus L-aspartates et D-isoaspartates ne font pas partie des substrats de la PIMT (Figure 1.2). Cette spécificité de réparation de la PIMT est due à l'orientation de l'atome d'azote, qui se trouve en avant-plan et qui empêche la PIMT de se fixer sur les résidus L-aspartates et D-isoaspartates (Clarke, 2003).

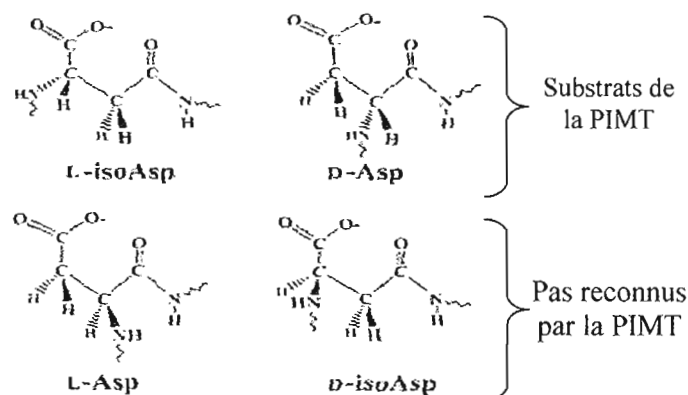


Figure 1.2 Configuration des résidus aspartates reconnus ou non par la PIMT (Tirée de Clarke, 2003).

Ainsi, la réparation des résidus L-isoaspartates par la PIMT se fait par le transfert d'un groupement méthyle, provenant de la SAM, sur les résidus carboxyles des protéines endommagées. Il y a alors formation d'un groupement méthylester sur la protéine ciblée et libération de S-adenosyl-L-homocystéine (SAH), qui peut agir comme inhibiteur compétitif de la réaction de méthylation. Le groupement méthylester de la protéine va par la suite s'hydrolyser spontanément et ainsi libérer du méthanol et former un intermédiaire succinimide qui se convertira à son tour en résidus aspartates ou L-isoaspartates. L'efficacité de réparation de la PIMT est d'environ 30%. Cependant, le cycle de réparation peut survenir plusieurs fois, assurant une réparation presque complète des protéines endommagées (Figure 1.3). L'activité de la PIMT est donc essentielle afin de maintenir un niveau très bas de protéines anormales dans les cellules.

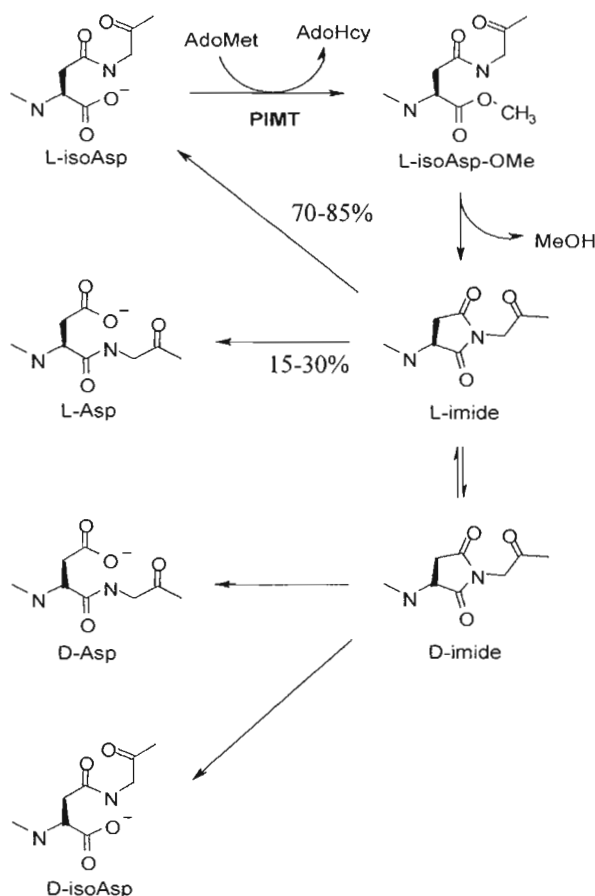


Figure 1.3 Mécanisme de réparation des protéines par la PIMT (Tirée de Young *et al*, 2005).

1.1.3 Rôles et implications biologiques de la PIMT

La PIMT permet donc à certaines protéines de retrouver leur fonction biologique, bien que plusieurs cycles peuvent être nécessaires afin d'obtenir une bonne efficacité de réparation. Cela a par ailleurs été démontré pour la calmoduline. En effet, il a été rapporté que la PIMT pouvait restaurer jusqu'à 50% de la capacité qu'a la calmoduline à activer la kinase dépendante du calcium (Jonhson, Langmack et Aswad, 1987). Il en est de même pour le collagène. Il a été démontré que le collagène de type I, provenant de rats âgés de 20 mois, diminuait jusqu'à 65% la motilité cellulaire. En ajoutant de la PIMT recombinante à ce collagène, il était possible de retrouver jusqu'à 72% de la migration cellulaire (Lanthier et Desrosiers, 2004). En plus de son implication dans la réparation des protéines, il a également été rapporté que la PIMT avait un rôle dans l'apoptose, le cancer et dans certains désordres neurologiques.

Il a en effet été rapporté que la PIMT avait un rôle anti-apoptotique. Une étude a démontré que la molécule CGP3466, qui s'apparente au R-(-)-Deprenyl, un médicament anti-Parkinsonien, permettait d'induire la PIMT au niveau transcriptionnel, dans des cellules astrogliales. Suite à cette observation, le même groupe a démontré que la surexpression de l'isoforme II de la PIMT protégeait les cellules neuronales de l'apoptose induite par Bax (Huebscher *et al*, 1999). Il semblerait donc que la PIMT puisse être associée à la survie cellulaire. Toutefois, la PIMT a été étudiée dans certains cancers et il a été démontré que le niveau de la PIMT diminuait dans tous les grades des tumeurs astrocytaires (Lapointe *et al*, 2005). D'un autre côté, plusieurs facteurs pouvant causer la formation de tumeurs, tels qu'une hypométhylation de l'ADN (Pascale *et al*, 2002) ou l'hyperhomocystéinémie (Wu et Wu, 2002) peuvent également influencer le niveau d'expression de la PIMT, en créant une déficience en SAM ou un excès de SAH. En plus d'être impliqué dans la formation de tumeurs, l'hyperhomocystéinémie, qui est une conséquence d'une déficience en acide folique, semble être à l'origine de certaines maladies telles que les maladies cardiovasculaires, l'Alzheimer et le Parkinson (Kruman *et al*, 2002). Par ailleurs, il a déjà été mentionné que la PIMT pourrait être impliquée dans des maladies de désordres neurologiques telles que l'Alzheimer (Roher *et al*, 1993; Shimuzu, Matsuoka et Shirasawa, 2005) et l'épilepsie (Yamamoto *et al*, (1998); Lanthier *et al*, 2002).

En effet, des études sur l'implication de la PIMT dans la maladie d'Alzheimer ont déjà été effectuées. Une de ces études a démontré que les résidus aspartates, aux positions 1 et 7, des peptides β -amyloïdes, étaient transformés en L-isoaspartates, D-isoaspartates et D-aspartates, dans des cerveaux atteints de la maladie d'Alzheimer (Roher *et al*, 1993). À partir de cette étude, le groupe de Shimizu (2005) a démontré une augmentation de la formation de résidus L-isoaspartates dans les peptides β -amyloïdes, impliqués dans la maladie d'Alzheimer. Ils ont étudié l'isomérisation des résidus en position 7 et 23 et en sont arrivés à la conclusion que les résidus isomérisés en position 23 augmentaient fortement l'agrégation des peptides dans les plaques séniles. Ils ont par la suite analysé l'expression de la PIMT dans des cerveaux atteints de l'Alzheimer et ont démontré que la PIMT est surexprimée dans les neurones, au niveau des dégénérescences neurofibrillaires, mais n'est pas localisée au niveau des plaques séniles, puisque ces dernières se trouvent à l'extérieur de la cellule. Ceci démontre donc l'importance de la PIMT dans les systèmes biologiques, notamment au niveau du cerveau. De ce fait, Yamamoto *et al* (1998) ont démontré que des souris déficientes pour le gène de la PIMT décèdent de l'épilepsie. Une autre étude a démontré que l'expression réduite de la PIMT dans des hippocampes d'humains atteints d'épilepsie était associée à l'accumulation de résidus L-isoaspartates dans différentes protéines, dont la tubuline (Lanthier *et al*, 2002). D'un autre côté, il a été démontré que des souris déficientes en PIMT, manipulées génétiquement de manière à réintroduire un gène codant pour la PIMT dans le cerveau, évitent les crises d'épilepsie (Shimizu *et al*, 2002) et peuvent même vivre jusqu'à 5 fois plus longtemps que des souris non traitées (Lowenson *et al*, 2001).

Il ne fait donc aucun doute que la PIMT occupe une place prépondérante dans les systèmes biologiques. Bien que son mécanisme d'action soit aujourd'hui bien élucidé et que de nombreuses études aient démontré son rôle dans plusieurs maladies, très peu d'études ont été effectuées jusqu'à présent sur les voies de signalisation pouvant réguler l'expression de la PIMT. Comme notre équipe a déjà démontré une diminution de l'expression et de l'activité de la PIMT dans les glioblastomes (Lapointe *et al*, 2005), nos efforts se sont portés sur l'étude du rôle de la PIMT dans les voies de survie cellulaire. Au cours de ces recherches, nous avons pu observer que l'expression de la PIMT est modulée par la présence de chlorure de lithium (LiCl), une molécule bien connue pour son implication dans le traitement des désordres bipolaires et qui agit principalement sur la protéine glycogène synthase kinase-3 (GSK-3).

1.2 La glycogène synthase kinase-3

1.2.1 Les propriétés de GSK-3

La glycogène synthase kinase-3 est une protéine multifonctionnelle du genre sérine/thréonine kinase. Cette protéine se retrouve sous une forme active dans la plupart des cellules eucaryotes, avec une forte concentration au niveau du cerveau (Tung et Reed, 1989), et peut être inhibée suite à l'activation de nombreuses voies de signalisation (Woodgett, 2001). La protéine GSK-3 possède deux isoformes, codées par deux gènes distincts : GSK-3 α et GSK-3 β (Figure 1.4). L'isoforme α a un poids moléculaire de 51 kDa alors que celui de l'isoforme β est de 47 kDa. Cette différence de masse s'explique par le fait que la forme α possède, à son extrémité N-terminale, une extension riche en glycine (Doble et Woodgett, 2003). Ces deux isoformes sont homologues à 98% au niveau de leur domaine kinase mais sont très différentes au niveau de leur extrémité C-terminale, ne partageant que 36% d'homologie dans cette région (Woodgett, 1990). Par ailleurs, les fonctions de ces deux isoformes ne sont pas les mêmes. Le groupe de Hoeflich (2000) a démontré que des souris déficientes dans le gène codant pour GSK-3 β , mouraient en phase embryonnaire, dû à de nombreuses lésions au foie. Comme les souris exprimaient tout de même la protéine GSK-3 α , ils ont donc démontré que la présence de cette isoforme ne pouvait compenser la perte des fonctions liées à GSK-3 β et que ces deux isoformes avaient bien des fonctions distinctes.

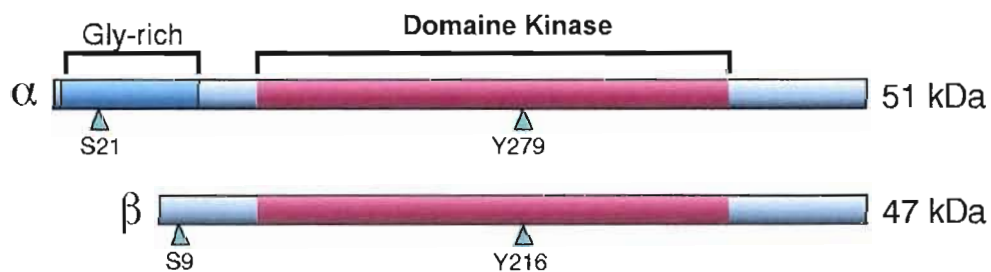


Figure 1.4 Représentation des isoformes α et β de la protéine GSK-3 (Tirée de Doble et Woodgett, 2003).

La protéine GSK-3 est constitutivement active dans les cellules. Toutefois, afin de pouvoir effectuer la phosphorylation de ses nombreux substrats, ces derniers doivent être préférentiellement pré-phosphorylés (Figure 1.5A). La séquence portée par les substrats et reconnue par GSK-3 est Ser/Thr-X-X-X-Ser/Thr-P, où la Ser/Thr de départ est le résidu cible, X est n'importe quel acide aminé, mais généralement une proline, et la dernière Ser/Thr-P est le site qui doit être pré-phosphorylé (Doble et Woodgett, 2003). Un bon exemple de ce processus est la phosphorylation de la glycogène synthase (GS) par GSK-3. GSK-3 β ne va phosphoryler la GS que si elle est préalablement phosphorylée par la caséine kinase II sur la Ser656. Une fois cette phosphorylation effectuée, GSK-3 β pourra ensuite procéder à des phosphorylations successives des Ser652, Ser648, Ser644 et Ser640 de la GS. La phosphorylation par GSK-3 β va s'effectuer à partir de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale. Chaque phosphorylation dépend de la phosphorylation précédente (Dajani *et al*, 2001). Bien que cette pré-phosphorylation ne soit pas un prérequis absolu, elle augmente de 100 à 1000 fois l'efficacité de phosphorylation de nombreux substrats de GSK-3 (Thomas *et al*, 1999).

L'inactivation de GSK-3 se fait également par l'intermédiaire d'une phosphorylation (Figure 1.5B). C'est la phosphorylation de la Ser9 de GSK-3 β et de la Ser21 de GSK-3 α qui est responsable de son inhibition (Cross *et al*, 1995). Cette phosphorylation va jouer le rôle d'un pseudo substrat pré-phosphorylé et va occuper le site actif de GSK-3, l'empêchant ainsi de se lier à d'autres substrats. Toutefois, une mutation de GSK-3 au niveau de l'arginine 96 par une alanine, va amener un changement de polarité au niveau du site de liaison des substrats (Figure 1.5C). Ce changement va faire en sorte que même si la protéine GSK-3 est phosphorylée au niveau de la Ser9 ou Ser21, ces dernières ne pourront plus occuper le site actif de la protéine. Cette mutation permettra donc à GSK-3 de demeurer active et de pouvoir phosphoryler des substrats qui ne seront pas pré-phosphorylés (Doble et Woodgett, 2003).

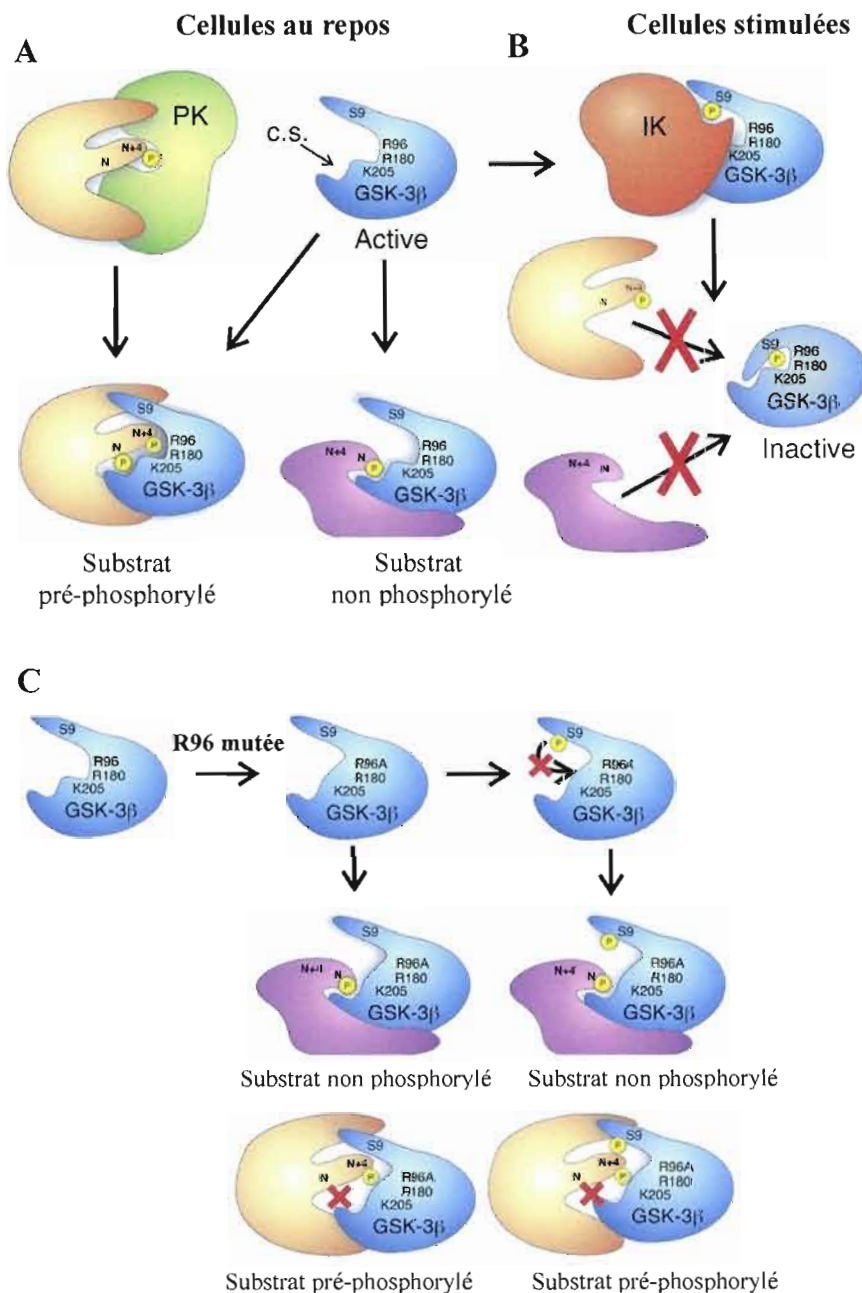


Figure 1.5 Régulation de l'activité de GSK-3 β par la phosphorylation de la Ser9 (Tirée de Doble et Woodgett, 2003). **A**) Phosphorylation par GSK-3 β des substrats non phosphorylés ou pré-phosphorylés par une autre protéine kinase (PK), dans les cellules au repos (C.S. : site catalytique). **B**) Inactivation de GSK-3 β par l'intermédiaire d'une kinase inhibitrice (IK) qui phosphoryle GSK-3 β sur la Ser9. **C**) Effet de la mutation de l'arginine 96 par une alanine sur l'activité de GSK-3 β .

1.2.2 Voies de signalisation impliquant GSK-3

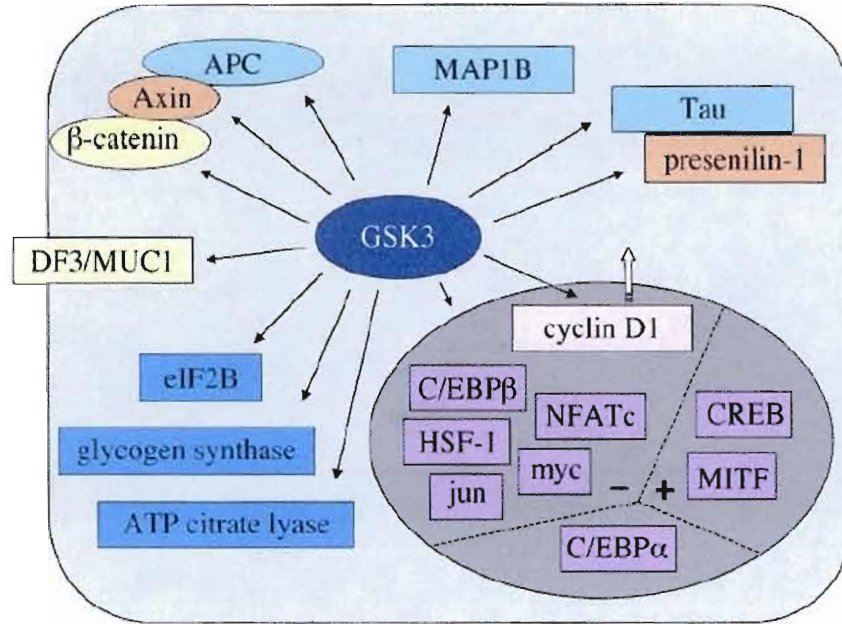


Figure 1.6 Substrats de GSK-3 (Tirée de Frame et Cohen, 2001).

La figure 1.6 montre les multiples substrats que peut phosphoryler GSK-3. La grande quantité de substrats associés à GSK-3 démontre bien l'importance de cette protéine dans la cellule. En effet, la glycogène synthase kinase-3 joue un rôle crucial dans la cellule puisqu'elle est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation, la plus connue étant sans aucun doute la voie de l'insuline. La première fonction à avoir été attribuée à GSK-3, il y a de cela plus de 20 ans, est la phosphorylation et l'inactivation de la glycogène synthase, entraînant ainsi l'arrêt de la synthèse de glycogène. Tout ce processus s'effectue dans des cellules au repos. Toutefois, lorsque les cellules reçoivent un signal provenant de l'insuline, il y a alors activation de la voie du phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). Cette protéine, par l'intermédiaire de différentes cascades, va permettre la phosphorylation et l'activation de la protéine Akt. Une fois activée, cette protéine peut phosphoryler la Ser9 ou la Ser21 de GSK-3 et ainsi l'inactiver, ce qui permettra éventuellement d'activer la glycogène synthase (Frame et Cohen, 2001) et de rétablir la synthèse de glycogène. De plus, l'inactivation de GSK-3 par cette voie de signalisation va permettre une augmentation de la synthèse des protéines via la déphosphorylation et

l'activation de eIF2B, un facteur d'initiation de la synthèse protéique. GSK-3 peut également être inhibée par la voie des MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*). Dans ce cas-ci, ce sont les facteurs de croissance comme l'EGF (*Epidermal growth factor*) ou le PDGF (*Platelet-derived growth factor*) qui vont stimuler la voie des MAPK, entraînant l'activation de la MAPK AP-K1 (*MAPK-activated protein kinase1*), qui à son tour va phosphoryler GSK-3 et l'inactiver. Ceci aura pour effet d'activer certaines protéines impliquées dans le cycle cellulaire ou certains facteurs de transcription tels que la cycline D1 (Diehl et al, 1998) ou la protéine c-Myc (Gregory, Qi et Hann, 2003). De la même manière, les protéines S6K1 (p70S6 kinase), PKA (protéine kinase A) et PKC (protéine kinase C) peuvent aussi phosphoryler et inhiber GSK-3 (Doble et Woodgett, 2003).

Une autre voie de signalisation importante, impliquant GSK-3, est la voie de Wnt. Les protéines Wnt sont une famille de protéines extracellulaires, riches en cystéines et glycosylées, qui jouent un rôle dans la différenciation, la croissance, la migration ainsi que dans la survie cellulaire (Smalley et Dale, 1999). En absence de signal provenant de Wnt, GSK-3 est active et peut donc phosphoryler l'axine, l'APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) et la β -caténine qui sont associées les unes avec les autres dans un complexe multi-protéique. La β -caténine ainsi phosphorylée est alors ubiquitinylée puis dégradée par le protéasome (Aberle *et al*, 1997). Lorsque la protéine Wnt se lie à son récepteur transmembranaire Frizzled, il y a alors activation de la voie de signalisation et inactivation de GSK-3. Toutefois, contrairement à la voie de l'insuline, cette inactivation ne semble pas être médiée par une phosphorylation de la Ser9 de GSK-3 β (Ding, Chen et McCormick, 2000). Bien que le mécanisme exact de l'inactivation de GSK-3 dans cette voie de signalisation ne soit pas encore clairement établi, une hypothèse stipule que GSK-3 interagit avec une protéine FRAT (*Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas*) qui l'empêcherait d'agir. Cette protéine interagit également avec une protéine importante de la voie de Wnt, soit la protéine Dsh (*Dishevelled*), et leur association permettrait de rompre les liens du complexe multi-protéique impliquant GSK-3 (Frame et Cohen, 2001). De cette manière, GSK-3 ne pourrait plus phosphoryler la β -caténine, ce qui permettrait à cette dernière de s'accumuler dans la cellule et d'être éventuellement dirigée vers le noyau, où elle pourra activer certains gènes, par l'intermédiaire de différents facteurs de transcription, dont le TCF/LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancer factor*) (Doble et Woodgett, 2003).

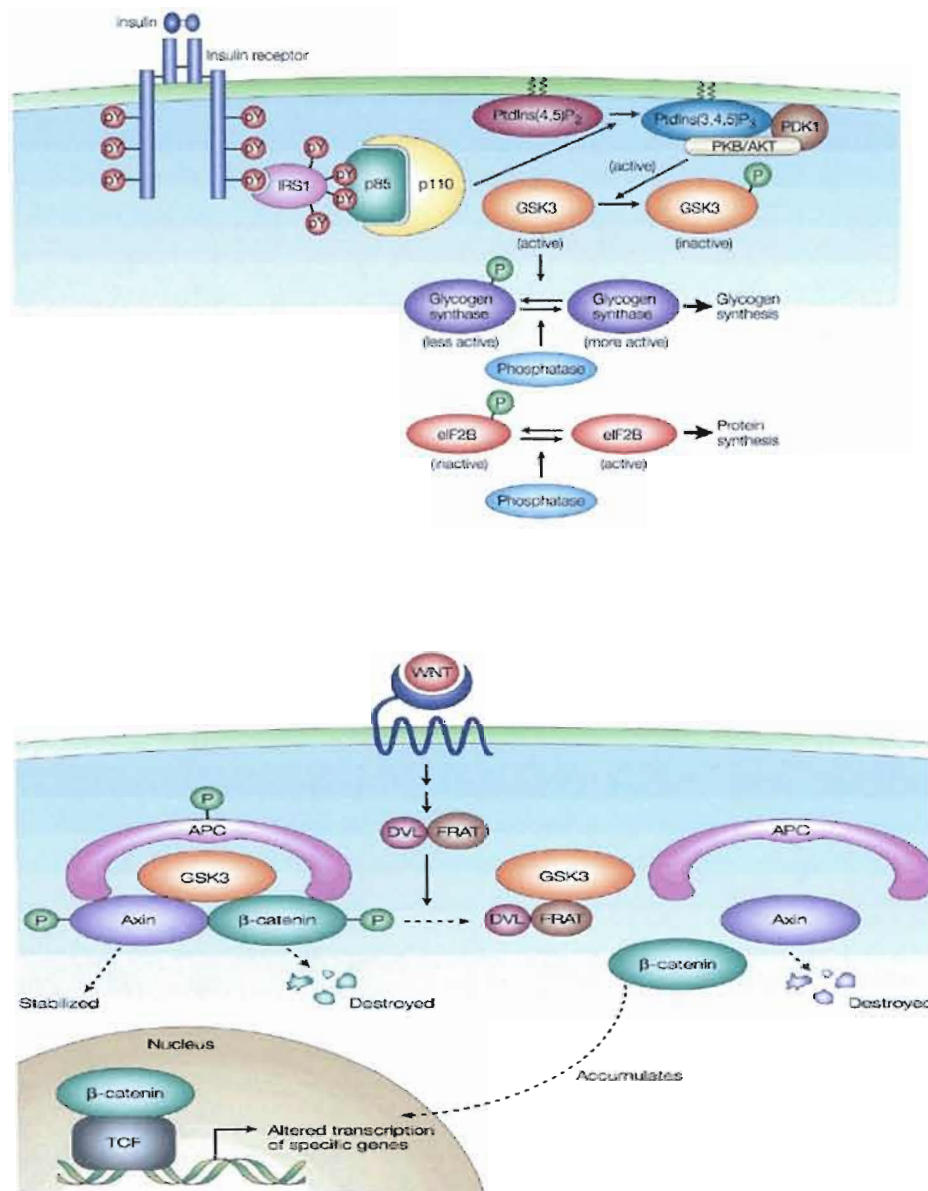


Figure 1.7 Voies de signalisation impliquant GSK-3 (Tirée de Cohen et Frame, 2001).

Comme GSK-3 est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation, cela signifie inévitablement que cette protéine soit également impliquée dans des pathologies liées à la dérégulation de ces voies de signalisation. Il n'est donc pas étonnant de voir que de nombreuses études aient associé GSK-3 à des maladies telles que le diabète, le cancer, l'Alzheimer et, plus récemment, aux désordres bipolaires.

1.2.3 Implications biologiques de GSK-3

Suite à la découverte du rôle de GSK-3 dans la synthèse du glycogène, de nombreuses études ont été effectuées afin de déterminer si cette protéine pouvait avoir une implication dans le diabète. Or, une étude a démontré que l'activité de GSK-3 est plus élevée dans les tissus diabétiques, ce qui en fait une excellente cible thérapeutique pour la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 (Kaidanovich et Eldar-Frinkelman, 2002). Par ailleurs, le groupe de Plotkin *et al* (2003) a synthétisé un peptide dont la séquence est celle d'un substrat pré-phosphorylé pouvant être reconnu par GSK-3. Ce peptide peut donc agir comme inhibiteur compétitif de cette protéine et ainsi permettre une augmentation de la synthèse de glycogène dans des cellules HEK 293 et une meilleure capture du glucose par des adipocytes primaires de souris, et ce en présence ou en absence d'insuline. Ceci démontre bien l'implication que peut avoir GSK-3 dans le diabète.

D'un autre côté, la voie de Wnt est une des voies de signalisation dont le dérèglement est souvent associé au cancer et, puisque plusieurs substrats de GSK-3 sont des protéines impliquées dans le cycle cellulaire, il devient intéressant d'étudier le rôle que peut jouer cette protéine dans le cancer. De ce fait, il a été rapporté que GSK-3 contribue à la prolifération de cellules d'ovaires humains cancéreuses, en activant le facteur de transcription NF-kappaB (Cao, Lu et Feng, 2006). De plus, dans la même étude, il a été démontré qu'une inhibition de cette protéine prévenait la formation de tumeurs, après l'injection de cellules d'ovaires cancéreuses, dans des souris nues (Cao, Lu et Feng, 2006). Par ailleurs, de nombreux articles rapportent l'activation de NF-kappaB par GSK-3 dans différents cancers tels que ceux du pancréas, de la prostate et de l'intestin (Ougolkov *et al*, 2005; Misra, Deedwania et Pizzo, 2006 ; Shakoori *et al*, 2005). Encore une fois, GSK-3 devient une cible thérapeutique intéressante pour éviter la progression de certaines formes de cancer.

Dans un autre ordre d'idées, des études récentes ont démontré que GSK-3 est également impliqué dans des maladies neurologiques dont l'Alzheimer et les troubles bipolaires. Dans l'Alzheimer, l'activité de GSK-3 est augmentée, ce qui résulte en une hyper-phosphorylation de la protéine Tau, le composant principal des dégénérescences neurofibrillaires dans les cerveaux d'Alzheimer. Cette hyper-phosphorylation passerait toutefois par l'intermédiaire de l'activation de la protéine MARK2 (*microtubule affinity-*

regulating kinase 2), qui à son tour procéderait à la phosphorylation de la Ser262 de Tau (Kosuga *et al*, 2005). Cependant, le lithium semble pouvoir prévenir cette hyper-phosphorylation. Une étude a démontré que lorsque des cellules neuronales NT2N étaient mises en présence de lithium, l'hyper-phosphorylation de Tau diminuait, et que ce processus s'effectuait par l'inhibition de GSK-3 (Hong *et al*, 1997). Par ailleurs, l'implication de GSK-3 dans les désordres bipolaires, a été associée à son inhibition par le lithium. En effet, le lithium est un médicament utilisé depuis plus de 50 ans pour traiter les cas de maniaque-dépression. Toutefois, son rôle comme inhibiteur de GSK-3 n'est apparu qu'au début des années 1990. Il semblerait que le lithium puisse inhiber GSK-3 de deux manières (Figure 1.8). Premièrement, le lithium peut agir directement sur GSK-3 comme inhibiteur compétitif du Mg^{2+} , ce qui empêche GSK-3 d'être active et de phosphoryler ses substrats. Deuxièmement, le lithium pourrait inhiber indirectement GSK-3 en empêchant partiellement sa déphosphorylation par des phosphatases (Jope, 2003). Dans les désordres bipolaires, le traitement au lithium ne donne des résultats qu'après un traitement chronique avec une dose de lithium équivalente à la moitié de son IC_{50} , soit de 1 mM. Cela implique donc que l'inhibition de GSK-3 dans cette maladie se ferait probablement de manière indirecte, donc plus lentement, et de manière partielle, permettant ainsi de conserver les fonctions cruciales de GSK-3 dans la cellule. Un fait intéressant est que la protéine GSK-3 partage certaines similitudes avec la PIMT : ces deux protéines se retrouvent en forte concentration dans le cerveau et elles sont toutes deux impliquées dans des maladies neurologiques dont l'Alzheimer. Par ailleurs, notre équipe a récemment démontré que la PIMT peut être régulée par la protéine mTOR, une protéine qui a également un effet sur GSK-3, par l'intermédiaire de la S6K1 (Frame et Cohen, 2001). Il devient donc intéressant d'étudier le lien entre GSK-3 et la PIMT.

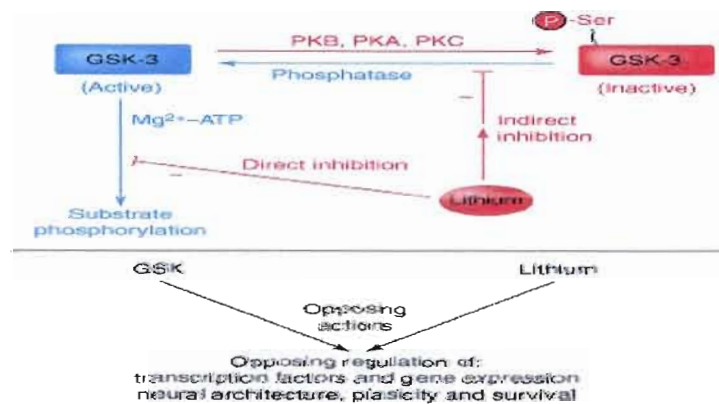


Figure 1.8 Mécanismes d'inhibition de GSK-3 par le lithium (Tirée de Jope, 2003).

1.3 Objectifs de la recherche

La PIMT occupe une place importante au sein des cellules, particulièrement au niveau du cerveau. Cela a par ailleurs été démontré par de nombreuses études démontrant son implication dans plusieurs maladies neurologiques. Bien que son mécanisme d'action soit aujourd'hui clairement établi, les voies de signalisation pouvant réguler l'expression et l'activité de la PIMT ne sont encore que très peu connues. Il est essentiel de connaître la base de la régulation de cette protéine afin de mieux comprendre son rôle dans la cellule puis éventuellement identifier des cibles thérapeutiques, que ce soit pour le cancer, l'épilepsie ou l'Alzheimer. C'est pourquoi notre étude s'est attardée sur le lien qui pouvait exister entre la PIMT et GSK-3. Des recherches préliminaires, effectuées par notre laboratoire, sur le lien entre la protéine mTOR et la PIMT ont permis d'identifier une modulation de l'expression de la PIMT en présence de lithium, un inhibiteur de GSK-3. Notre étude s'est donc effectuée sur des cellules cancéreuses de cerveau humain, des glioblastomes (U-87), qui présentent une forte concentration en PIMT et en GSK-3. Le traitement de ces cellules par différents inhibiteurs de GSK-3 a démontré une augmentation de l'expression de la PIMT et cette augmentation serait probablement associée à la phosphorylation de GSK-3.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel

La lignée cellulaire de glioblastomes U-87 a été obtenue d'American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, États-Unis). Le lithium, le myo-inositol et l'acide valproïque proviennent de Sigma Aldrich (Oakville, Ontario, Canada) alors que les inhibiteurs pharmacologiques de GSK-3, soit SB-216763 et SB-415286, proviennent de TOCRIS Bioscience (Ellisville, MO, États-Unis). Le siRNA contre GSK-3 a été obtenu de Cell Signaling Technology (Beverly, MA, États-Unis). Les inhibiteurs de kinases, H-89, Calphostin C et l'inhibiteur d'Akt ont été obtenus de Calbiochem (San Diego, CA, États-Unis). L'anticorps contre la PIMT provient du service de production d'anticorps de l'Institut de recherche en biotechnologie (Montréal, Québec, Canada). Les anticorps contre GSK-3 α phosphorylée et contre la β -caténine ont été obtenus de Cell Signaling Technology (Beverly, MA, États-Unis) alors que l'anticorps contre la forme phosphorylée de GSK-3 β a été obtenu de Cedarlane Laboratories (Hornby, Ontario, Canada) et l'anticorps contre GSK-3 α/β a été acheté chez Calbiochem (San Diego, CA, États-Unis). L'anticorps contre l' α -tubuline provient de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, États-Unis). Les anticorps secondaires anti-lapin et anti-souris ont été acquis de Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, États-Unis).

2.2 Méthodes

2.2.1 Culture cellulaire

Les cellules U-87 ont été maintenues en culture dans un milieu MEM (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) contenant 10 % de sérum de veau supplémenté (Hyclone Laboratories, Logan, UT) et 10 mM de pyruvate à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

2.2.2 Traitements des cellules avec différents inhibiteurs

Les cellules U-87 ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits (34,8 mm de diamètre) à raison de 50 000 cellules par puits et incubées dans du milieu MEM avec sérum pendant 48 heures. Par la suite, les cellules ont été traitées en présence de sérum avec les différents agents pour vérifier l'effet de l'inhibition de GSK-3 sur la PIMT, soit le lithium, le myo-inositol, l'acide valproïque, le SB-216763 et le SB-415286. Les cellules ont aussi été mises en présence de différents inhibiteurs de protéines kinases, soit un inhibiteur de la protéine kinase A, le H-89, un inhibiteur de la protéine kinase C, le Calphostin C et un inhibiteur de la protéine kinase B, l'inhibiteur d'Akt. Lorsque le contrôle l'exigeait, les cellules étaient mises en présence de 0.1% de diméthylsulfoxyde (DMSO). Après le temps d'incubation approprié, les cellules ont été lysées et l'expression des protéines a été vérifiée par immunobuvardage de type Western.

2.2.3 Traitement des cellules avec un siRNA contre GSK-3 α/β

Les cellules U-87 ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits à raison de 50 000 cellules par puits et incubées dans du milieu MEM avec sérum mais pendant 24 heures. Par la suite, le milieu de culture est remplacé par du milieu MEM avec sérum frais et les cellules sont mises en présence d'une solution contenant du milieu MEM sans sérum, un agent de transfection HighPerfect avec ou sans le siRNA contre GSK-3 α/β de manière à obtenir une concentration finale de 50 nM. Le traitement avec siRNA a été de 48 heures. Par la suite les cellules ont été lysées et l'expression de GSK-3 en présence du siRNA a été vérifiée par immunobuvardage de type Western.

2.2.4 Lyse cellulaire

Après deux lavages avec un tampon phosphate salin (PBS) ne contenant ni calcium ni magnésium, préchauffé à 37°C, les cellules ont été lysées dans du tampon de lyse RIPA (300 mM NaCl, 2% Nonidet P40, 1% acide déoxycholique, 0,2% SDS (sodium dodécyl sulfate) et 100 mM Tris, pH 7,4) également préchauffé à 37°C et contenant des inhibiteurs de phosphatases (NaF et NaVO₃ à 1 mM chacun). Les cellules ont ensuite été récoltées et conservées sur la glace pendant 30 minutes, avec agitation aux 5 minutes. Par

la suite, les cellules ont été centrifugées à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C et le surnageant a été conservé à -40°C jusqu'à ce que les échantillons soient analysés.

2.2.5 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide et immunobuvardage de type Western

Les protéines contenues dans les différents échantillons ont été dosées par la méthode de micro-BCA de Pierce (Rockford, IL, États-Unis). Par la suite, 15 µg de protéines ont été prélevés et mixés avec un tampon d'échantillon pour électrophorèse (62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 10% Glycérol, 2 % SDS, 5% β-mercaptoéthanol et 0,00625% bleu de bromophénol) puis chauffés à 100°C pendant 4 minutes. Les échantillons ainsi préparés ont ensuite été déposés sur gels de polyacrylamide selon la méthode de Laemmli (1970). Les gels de séparation utilisés contenaient 12,5% (p/v) d'acrylamide et 0,3 % (p/v) de N,N-méthylène-bis-acrylamide, 0,375 M de Tris/HCl à pH 8,8, 0,1% (v/v) de SDS, 0,5 µl/ml de N,N,N',N-tétraméthylènediamine (TEMED) et 0,5 mg/ml de persulfate d'ammonium (APS). Les gels d'entassement contenaient 3,8% (p/v) d'acrylamide et 0,1% (p/v) de N,N-méthylène-bis-acrylamide, 0,125 M de Tris/HCl pH 6,8, 0,1% (v/v) de SDS, 1 µl/ml de TEMED et 0,5 mg/ml d'APS. La migration des protéines s'est effectuée à 120 volts pendant 30 minutes et s'est poursuivie à 170 volts jusqu'à ce que le bleu de bromophénol soit sorti du gel.

Suite à l'électrophorèse, les protéines ont été transférées sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF) ayant une porosité de 0,45 µm. Les transferts ont été effectués à 80 mA pour chaque gel pendant 1 heure dans un tampon de transfert (96 mM glycine, 10 mM Tris et 10% méthanol). Les membranes ont ensuite été incubées à température pièce, pendant 1 heure dans un tampon de blocage Tris salin (TBS) (150 mM NaCl et 20 mM Tris/HCl pH 7,5) contenant 0,1% de Tween-20 et 5% de lait en poudre.

2.2.6 Immunodétection des protéines

Après le blocage des sites de liaisons non spécifiques, les membranes ont subi 3 lavages successifs de 15 minutes dans un tampon TBS contenant 0,3% de Tween-20. Par la suite, les membranes ont été incubées à 4°C pendant toute la nuit en présence de l'anticorps primaire approprié. Les anticorps ont été dilués dans un tampon TBS contenant 0,1% de Tween-20 et 3% de sérum d'albumine bovine (BSA) sauf pour l'anticorps contre la PIMT : PIMT 1 :50 000, GSK-3 α/β 1 :5000, phosphoGSK-3 α et phosphoGSK-3 β 1 :1000, β -caténine 1 :10 000 et α -tubuline 1 :250. Par la suite, les membranes ont de nouveau subi 3 lavages successifs de 15 minutes dans un tampon TBS contenant 0,3% de Tween-20 puis ont été incubées pendant 1 heure à température pièce en présence des anticorps secondaires couplés à la peroxydase et dilués 1 :2500 dans un tampon TBS contenant 0,1% de Tween-20 et 5% de lait en poudre. Suivant cette incubation, les membranes de PVDF ont été mises en présence d'une solution permettant d'obtenir un signal de chemiluminescence (ECL) pendant 1 minute puis, elles ont été exposées sur des films Fuji pour la détection des protéines d'intérêt. L'analyse de l'intensité relative des différentes protéines détectées sur les autoradiogrammes a été effectuée à l'aide d'un logiciel de densitométrie intégré à un système d'imagerie numérique.

2.2.7 Analyse de l'ARNm par RT-PCR

Les cellules traitées avec le lithium, l'acide valproïque et le SB-415286 ont été directement lysées puis récoltées dans du Trizol (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). Après une incubation de 5 minutes dans ce produit, un volume de chloroforme a été ajouté aux différents échantillons, qui ont par la suite subi une vigoureuse agitation et une incubation de 3 minutes à la température pièce. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 12 000 g pendant 15 minutes à 4°C. La phase aqueuse supérieure de chaque échantillon a été conservée puis un volume d'isopropanol a été ajouté pour précipiter l'ARN. Les échantillons ont alors été centrifugés à 12 500 g pendant 10 minutes à 4°C. Après avoir retiré le surnageant, les culots d'ARN obtenus ont été lavés avec un volume d'éthanol 75% puis centrifugés à 9 500 g pendant 5 minutes à 4°C. Après avoir de nouveau retiré les surnageants, les culots d'ARN ont été séchés à l'air libre pendant environ 10 minutes puis conservés à -80°C.

Après le dosage de l'ARN, 1 µg a été prélevé afin d'effectuer l'amplification par RT-PCR. Pour effectuer la réaction de RT-PCR, nous avons utilisé le « SuperScript One-Step RT-PCR with *Platinum Taq System* » (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). L'étape de transcription inverse a été effectuée à 50°C, pendant 20 minutes. Pour amplifier l'ADNc de la PIMT, l'amorce sens utilisée était : 5'-GAAGCCCCTTATGATGCCATTC-3' et celle de l'amorce antisens était : 5'-TTTGAGGACTGAAGATGAGCAATCC-3'. Ces amorces ont permis de générer des produits de 299 pb et de 346 pb, correspondant respectivement à l'isoforme I et II de la PIMT. Comme contrôle, l'amplification de l'α-tubuline a été effectuée à l'aide de l'amorce sens qui était : 5'-GCCATTGCCACCATCAAGAC-3' et l'amorce antisens était : 5'-CACACCAACCTCCTCATAATCCTTC-3'. Pour les étapes d'amplification des ADNc, la température était maintenue à 94°C pour 2 minutes afin de réaliser la dénaturation. Par la suite, l'amplification s'est déroulée à 94°C pour 45 secondes, ensuite 52°C pour 45 secondes et 72°C pour 90 secondes et ce durant 30 cycles, et s'est terminée par un prolongement de 7 minutes à 72°C. Les produits obtenus ont été déposés sur un gel d'agarose 1,8% pour l'analyse. La présence de bromure d'éthidium dans les gels a permis de visualiser les ADNc amplifiés.

2.2.8 Analyses statistiques

Les expériences ont été réalisées au moins trois fois chacune et les moyennes et les écarts-types ont été déterminés à l'aide du logiciel Prism de Macintosh. Les analyses statistiques ont été réalisées par test non païré selon la méthode du « *Student*_test ».

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 *Le traitement des cellules U-87 avec une dose thérapeutique de lithium induit l'expression de la PIMT*

Des résultats préliminaires, obtenus au laboratoire, ont démontré une modulation de l'expression de la PIMT dans des glioblastomes humains mis en présence d'une faible concentration de lithium, soit 50 μM . Or, la dose thérapeutique de lithium, utilisée notamment pour le traitement des troubles bipolaires, est de 1 mM (Jope, 2003). Dans cette optique, nous avons voulu vérifier l'expression de la PIMT, dans une cinétique, en employant une dose thérapeutique de lithium. La figure 3.1A démontre une augmentation de l'expression de la PIMT en présence du lithium, pour chacun des temps étudiés, cette augmentation de la PIMT étant maximale à 48 heures. Un fait intéressant à noter est que l'expression de la PIMT, dans les cellules non traitées, augmente également en fonction du temps, selon la confluence des cellules. C'est pour cette raison qu'un contrôle a été effectué pour chaque temps de traitement avec le lithium. De plus, comme la molécule de lithium utilisée pour le traitement des cellules se compose de deux ions (Li^+ et Cl^-), nous voulions nous assurer que la réponse observée était bien liée à l'effet du lithium plutôt qu'à celle du chlore. Nous avons donc comparé l'expression de la PIMT dans des cellules mises en présence de chlorure de lithium ou de chlorure de sodium. La figure 3.1B montre encore une fois l'augmentation de l'expression de la PIMT en présence de lithium mais aucun effet marqué de la part du sodium, sinon une faible diminution de l'expression de la PIMT. Il est important de mentionner que les conditions d'incubation n'étaient pas les mêmes que pour la cinétique. Dans ce cas-ci, les cellules ont été traitées avec 10 mM de lithium, pendant 1 heure, dans le but d'optimiser l'inhibition de GSK-3. Toutefois, l'effet sur l'expression de la PIMT demeure sensiblement le même que celui obtenu lors du traitement de 48 heures avec 1 mM, durant la cinétique. Ces conditions ont donc été conservées pour les manipulations subséquentes.

Donc, comme l'augmentation de l'expression de la PIMT semble bien être associée à l'effet du lithium, nous avons par la suite tenté d'identifier quel pouvait être le mécanisme utilisé par le lithium pour influencer la PIMT.

3.2 Effets du myo-inositol et de l'acide valproïque sur l'expression de la PIMT

Dans la cellule, le lithium possède deux cibles principales : l'inositol monophosphatase et la protéine GSK-3. Dans la voie de l'inositol, le lithium peut inhiber l'inositol monophosphatase et l'inositol polyphosphate 1-phosphatase. Ces deux enzymes jouent un rôle clé dans la régulation et la synthèse de l'inositol. Ainsi, en inhibant ces deux enzymes, le lithium crée une diminution de la concentration d'inositol dans la cellule (Williams et Harwood, 2000). À partir de ces informations, nous avons voulu vérifier si l'augmentation de l'expression de la PIMT observée en présence de lithium pouvait être associée à une baisse du niveau d'inositol dans la cellule. Pour ce faire, nous avons traité les cellules avec du lithium et/ou du myo-inositol. La présence du myo-inositol lors du traitement avec le lithium pourrait ainsi compenser pour la perte en inositol provoquée par le lithium et, s'il y a lieu, empêcher la surexpression de la PIMT. En conséquence, nous avons pu constater que le myo-inositol seul ne modifie pas l'expression de la PIMT et que la combinaison du myo-inositol et du lithium entraîne une légère augmentation de la PIMT, tout comme le lithium seul (Figure 3.2A). Ces résultats suggèrent donc que l'augmentation de l'expression de la PIMT par le lithium passe probablement par un autre mécanisme que la voie de l'inositol. Or, le lithium est également connu pour son inhibition de la protéine GSK-3. Afin de vérifier si l'effet du lithium sur la PIMT pouvait être associé à son inhibition de GSK-3, nous avons traité les cellules avec de l'acide valproïque (VPA), un agent également utilisé pour le traitement des troubles bipolaires et connu pour inhiber GSK-3 (Chen *et al*, 1999), bien que son mécanisme d'action ne soit pas encore très bien élucidé. Nous avons donc incubé les cellules pendant 1 heure en présence d'une dose thérapeutique d'acide valproïque, soit 600 μ M ainsi que des doses légèrement supérieures de 1 et 2 mM, puis nous avons comparé l'expression de la PIMT dans ces conditions, avec celle obtenue en présence de lithium. De la sorte, nous avons pu observer une augmentation marquée de l'expression de la PIMT en présence des différentes doses d'acide valproïque qui est sensiblement pareille à celle observée lors du traitement avec le lithium (Figure 3.2B). Ces résultats ont donc axé notre étude sur l'implication de l'inhibition de GSK-3 dans la modulation de l'expression de la PIMT.

3.3 L'inhibition de GSK-3 stimule l'expression de la PIMT

Bien que le lithium et l'acide valproïque soient connus pour inhiber GSK-3, il demeure toutefois que ces inhibiteurs ne sont pas spécifiques à GSK-3. Tel que mentionné précédemment, le lithium peut également agir sur l'inositol alors que l'acide valproïque peut agir sur de nombreuses autres protéines telles que PKC, MAPK ou Bcl-2 (Harwood et Agam, 2003). Alors, afin de vérifier si les résultats obtenus précédemment pouvaient être liés à l'inhibition directe de GSK-3, nous avons regardé l'expression de la PIMT après un traitement des cellules avec des inhibiteurs spécifiques à GSK-3 : SB-216763 et SB-415286. Ce sont des inhibiteurs hautement sélectifs, qui compétitionnent avec l'ATP pour inhiber les deux formes de GSK-3 et qui possèdent des IC_{50} respectives de 34 nM et 78 nM (Cross *et al.*, 2001). Cependant, le SB-216763 est peut-être légèrement moins efficace que le SB-415286 dû au fait qu'il a tendance à précipiter lorsqu'il est en présence d'eau. Ainsi, le traitement des cellules avec ces deux inhibiteurs spécifiques de GSK-3 a permis de constater une forte augmentation de l'expression de la PIMT (Figure 3.3A). De plus, nous avons dans ce cas-ci vérifié l'expression de la β -caténine. Si GSK-3 est effectivement inhibée par les SB-216763, SB-415286 ou par le lithium, l'expression de la β -caténine devrait augmenter, dû à l'arrêt de sa dégradation et, par conséquent, nous devrions constater son accumulation dans la cellule. En observant la figure 3.3A, c'est effectivement ce qui peut être remarqué. Lorsque les cellules sont en présence des différents inhibiteurs de GSK-3, l'expression de la β -caténine a tendance à augmenter. Ceci suggère donc fortement que GSK-3 est inhibée, validant ces résultats. Par ailleurs, puisque les résultats obtenus tendent tous vers une régulation de la PIMT par l'intermédiaire de GSK-3, nous avons décidé d'employer un siRNA dirigé contre les deux isoformes de GSK-3. Toutefois, les résultats obtenus avec le siRNA ne sont guère concluants. En analysant l'expression des formes α et β de GSK-3, obtenue après le traitement de 48 heures avec le siRNA, il est possible de constater une faible inhibition des deux isoformes de la protéine (Figure 3.3B). Cependant, un point important dans ce résultat est que l'expression de la PIMT semble être stimulée de la même manière que la protéine GSK-3 est inhibée (Figure 3.3B). Ceci nous permet donc de penser que la PIMT peut effectivement être régulée par l'intermédiaire de GSK-3. Ces résultats préliminaires devront cependant être reproduits afin de valider la régulation de l'expression de la PIMT via GSK-3. Ainsi,

suite à ces résultats, nous avons tenté de savoir si la phosphorylation de GSK-3 pouvait être associée à l'augmentation de l'expression de la PIMT.

3.4 La phosphorylation de GSK-3 sur la sérine 9 est associée à l'augmentation de l'expression de la PIMT

Comme les résultats précédents suggéraient que c'est l'inhibition de GSK-3 qui contrôle l'expression de la PIMT, nous avons voulu nous en assurer en vérifiant l'état de phosphorylation sur la sérine 9 de GSK-3 β , qui est le site d'inhibition de la protéine. En théorie, plus GSK-3 est inhibée, plus son niveau de phosphorylation devrait être élevé. Par conséquent, si le niveau de phosphorylation de GSK-3 contrôle l'expression de la PIMT, nous devrions observer une augmentation du niveau d'expression de la PIMT. Nous avons donc utilisé les inhibiteurs de GSK-3, soit le lithium, l'acide valproïque et le SB-415286, puis avec un anticorps contre la forme phosphorylée de GSK-3 β , nous avons vérifié le niveau de phosphorylation de la protéine. Nous avons pu remarquer que le niveau de phosphorylation de la sérine 9 de GSK-3 β augmente en présence des différents inhibiteurs et ce, plus fortement en présence de lithium et de SB-415286 (Figure 3.4). Nous avons également vérifié l'expression de la PIMT et tel qu'attendu, le niveau d'expression de la PIMT semble suivre le niveau de phosphorylation de GSK-3 β . Ces résultats confirment donc que l'augmentation de l'expression de la PIMT, observée lors de l'inhibition de GSK-3, est associée à son niveau de phosphorylation. Ceci nous amenait alors à tenter de déterminer à quel niveau GSK-3 pouvait réguler la PIMT.

3.5 L'augmentation de l'expression de la PIMT par les inhibiteurs de GSK-3 est associée avec une augmentation de son ARNm ainsi qu'une augmentation de sa synthèse

Les quantités de protéines peuvent être régulées à deux niveaux : soit par la traduction de leur ARNm en protéines ou par leur dégradation. Afin de déterminer à quel niveau l'inhibition de GSK-3 influençait l'expression de la PIMT, nous avons d'abord analysé par RT-PCR l'expression de son ARNm après un traitement des cellules avec les différents inhibiteurs utilisés précédemment. Les résultats obtenus démontrent une augmentation de l'expression des deux isoformes de l'ARNm de la PIMT en présence de chaque inhibiteur de GSK-3. Cette augmentation est plus

marquée en présence d'acide valproïque et de SB-415286, l'inhibiteur spécifique de GSK-3, pour l'isoforme I (Figure 3.5A), alors que pour l'isoforme II, l'augmentation est sensiblement la même pour tous les inhibiteurs, quoique légèrement plus faible pour le SB-415286.

De plus, nous avons également vérifié si la PIMT pouvait être régulée par GSK-3 au niveau de sa synthèse. Pour ce faire, nous avons effectué un pré-traitement d'une heure avec de la cycloheximide, un agent connu pour inhiber l'élongation des protéines lors de leur synthèse, sur les cellules normalement traitées au lithium. Les résultats permettent de remarquer qu'il y a inhibition complète de la surexpression de la PIMT lorsque les cellules sont traitées conjointement avec la cycloheximide et le lithium (Figure 3.5B). Ces résultats suggèrent donc tout d'abord que l'inhibition de GSK-3 permet une régulation positive du niveau de l'ARNm de la PIMT, soit par une stabilité accrue de ces ARNm ou une augmentation de leur transcription. Aussi, l'inhibition de GSK-3, du moins par le lithium, semble stimuler la synthèse protéique de la PIMT et ainsi permettre une augmentation de son expression dans la cellule. Suite à ces résultats, nous avons tenté de déterminer si certaines voies de signalisation, qui impliquent GSK-3, peuvent influencer l'expression de la PIMT.

3.6 Les voies de PKA, PKC et Akt, impliquant GSK-3, ne semblent pas influencer l'expression de la PIMT

Les kinases PKA, PKC et Akt sont toutes impliquées dans la régulation de GSK-3. Lorsque ces kinases sont activées dans la cellule, GSK-3 est alors phosphorylée et inactivée (Doble et Woodgett, 2003). Nous avons tenté d'identifier si l'une de ces kinases qui régulent l'activité de GSK-3 pouvait influencer l'expression de la PIMT. Pour ce faire, nous avons utilisé des inhibiteurs pour chaque protéine, soit le H-89 pour la PKA, le Calphostin C pour inhiber PKC et un inhibiteur d'Akt. En inhibant ces kinases, GSK-3 devrait être moins phosphorylée dans la cellule. Nous voulions donc vérifier si cela pouvait avoir une influence sur l'expression de la PIMT. Or, en observant l'effet de ces inhibiteurs sur le niveau basal de phosphorylation de GSK-3, nous pouvons constater une légère diminution en présence des inhibiteurs de PKA et PKC mais rien de significatif (Figure 3.6A). Par ailleurs, nous avons également vérifié l'expression de la PIMT en présence de ces inhibiteurs et nous n'avons constaté aucune modification dans ces conditions (Figure

3.6A et B). Nous avons ensuite vérifié l'effet de la combinaison du lithium avec ces inhibiteurs. Nous remarquons que le lithium provoque une augmentation du niveau de phosphorylation de GSK-3 α et β (Figure 3.6A). Toutefois, il n'y a pas d'effets cumulatifs du lithium et des inhibiteurs de PKA et PKC sur la phosphorylation des deux isoformes de GSK-3 (Figure 3.6A), indiquant que le lithium agit sur la phosphorylation de GSK-3 indépendamment de ces kinases. De plus, il est possible de constater, comme dans les résultats précédemment obtenus dans la figure 3.4, que le niveau d'expression de la PIMT suit celui de la phosphorylation de GSK-3 mais avec une augmentation moins prononcée (Figure 3.6A).

D'un autre côté, un fait intéressant à remarquer est que l'inhibiteur d'Akt semble être celui qui a le plus d'effet sur la phosphorylation de GSK-3 et le niveau de la PIMT. En effet, si nous nous attardons aux résultats obtenus pour cet inhibiteur, il est possible d'observer une plus forte chute dans le niveau de phosphorylation de GSK-3 β et surtout de GSK-3 α (Figure 3.6A). De plus, c'est le seul inhibiteur qui semble influencer le niveau d'expression de la PIMT, qui diminue légèrement en présence de cet inhibiteur. Par ailleurs, lorsque l'inhibiteur d'Akt est mis en présence de lithium, il est possible d'observer une augmentation de la phosphorylation de GSK-3 mais cette augmentation est moins forte que pour les deux autres inhibiteurs (Figure 3.6A). Aussi, en présence de lithium et de l'inhibiteur d'Akt, le niveau d'expression de la PIMT ne varie pas (Figure 3.6B). Ce résultat suggère qu'il pourrait y avoir une régulation de la PIMT par GSK-3 via la voie de PI3K et Akt. Cependant, un traitement des cellules avec de la Wortmannin, un inhibiteur spécifique de la voie de PI3K, ne démontrait aucune modulation de l'expression de la PIMT (résultats non montrés). Donc, ces résultats permettent de conclure que les kinases PKA et PKC ne sont pas impliquées dans la régulation de la PIMT par GSK-3. D'autre part, il est possible que la kinase Akt, en agissant à travers la phosphorylation de GSK-3 α et β , puisse réguler l'expression de la PIMT. Cependant, des expériences supplémentaires seront nécessaires pour appuyer cette hypothèse de travail.

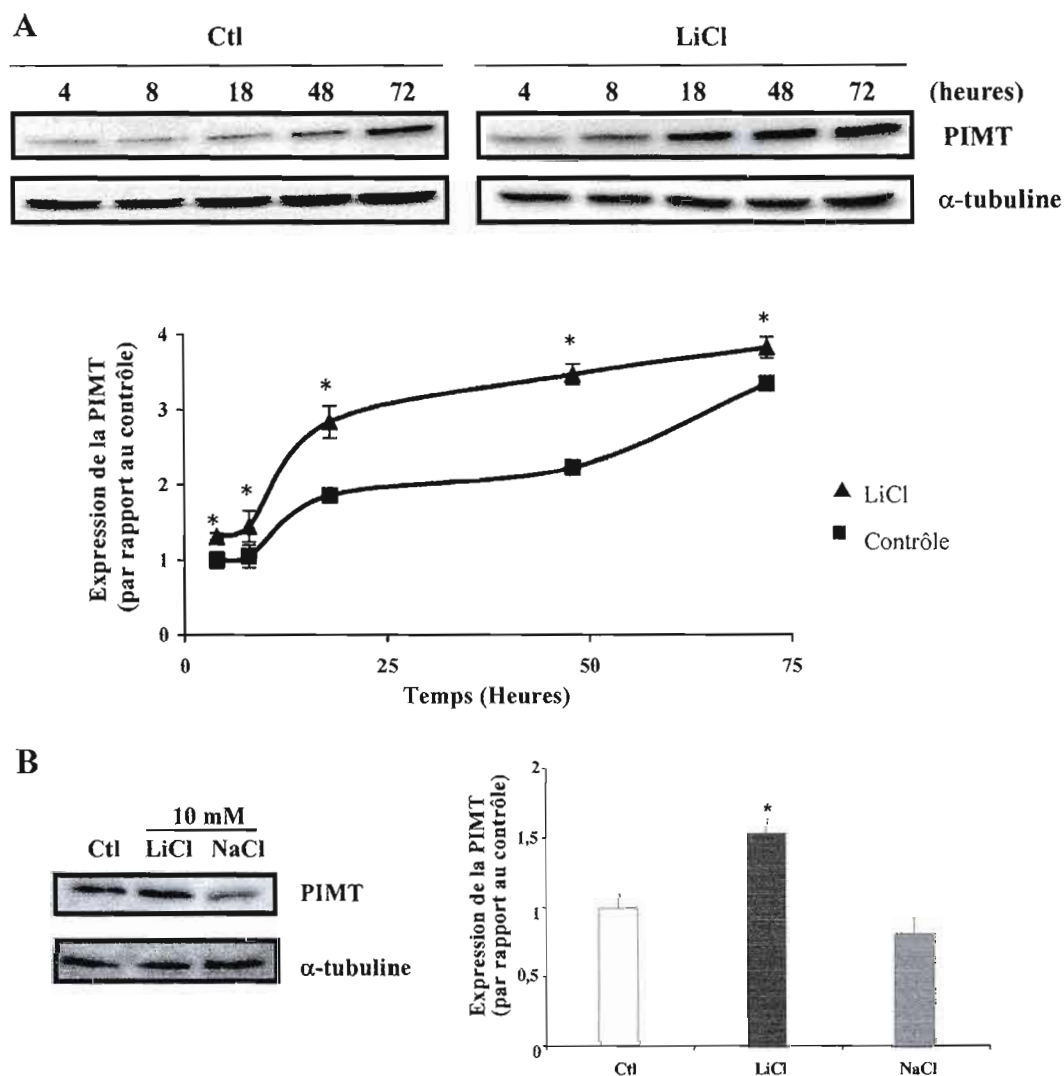


Figure 3.1 Cinétique de l'expression de la PIMT en présence d'une concentration thérapeutique de lithium. (A) Les cellules U-87 ont été mises en présence d'une concentration thérapeutique de chlorure de lithium (LiCl) de 1 mM pendant des temps de 4, 8, 18, 48 et 72 heures. Les cellules utilisées comme témoin ont été mises en présence d'eau pendant les mêmes temps d'incubation. (B) Les cellules U-87 ont été mises en culture en présence de chlorure de lithium (LiCl) et de sodium (NaCl) à une concentration de 10 mM pendant 1 heure afin de démontrer la spécificité du lithium à stimuler l'expression de la PIMT. Après les différents traitements, les cellules ont été lysées puis les protéines ont été déposées sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE et ont été soumises à un immunobuvardage de type Western. La PIMT a été immunodétectée ainsi que l' α -tubuline qui a servi de contrôle pour s'assurer d'une quantité constante de protéines dans chaque puits. L'analyse densitométrique de la PIMT est représentative de trois expériences individuelles et l'astérisque (*) identifie les valeurs de $p < 0,05$, pour le « Student Test », qui sont des valeurs considérées significativement différentes par rapport au témoin

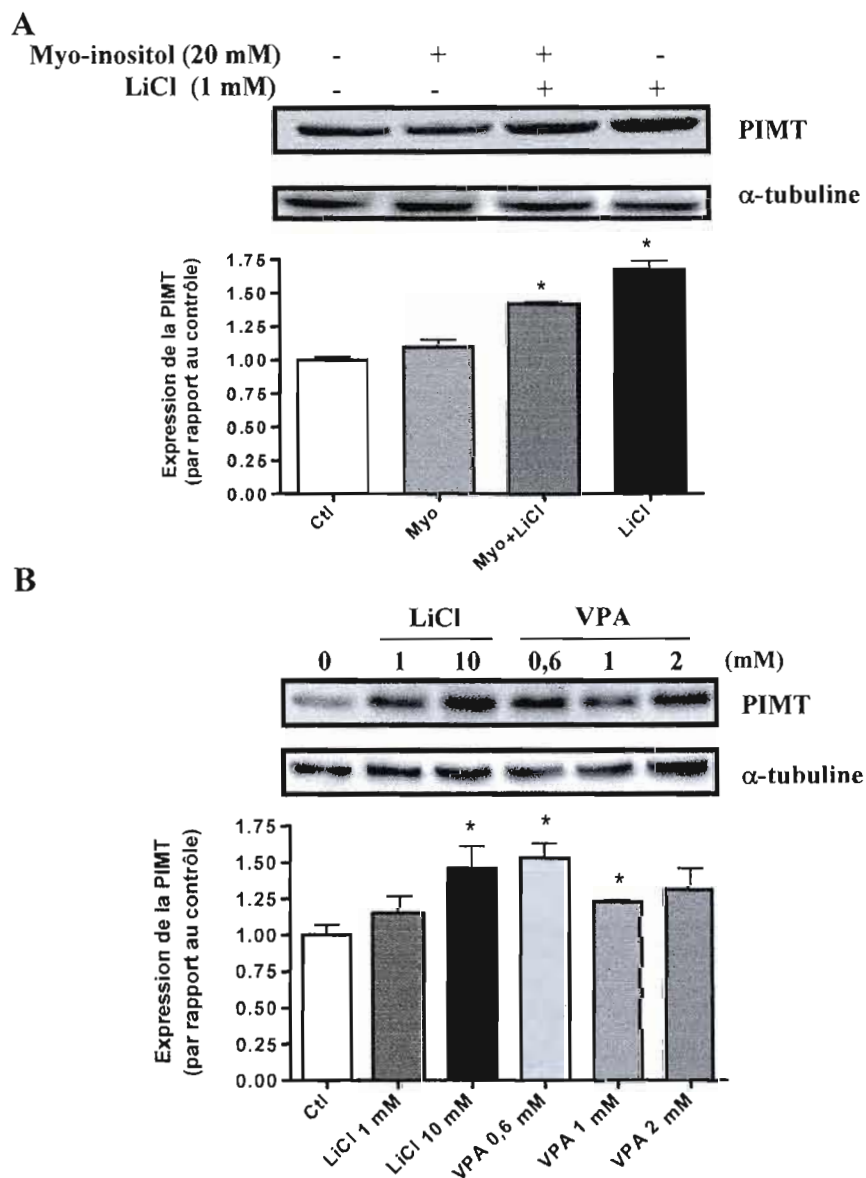


Figure 3.2 Effets du myo-inositol et de l'acide valproïque sur l'expression de la PIMT. (A) Les cellules U-87 ont été mises en présence de myo-inositol à 20 mM, de lithium (LiCl) à 1 mM ou d'un mélange myo-inositol 20 mM et lithium (LiCl) 1 mM pendant 18 heures. Les cellules utilisées comme témoin ont été mises en présence d'eau pendant 18 heures. (B) Les cellules U-87 ont été mises en présence de lithium (LiCl) à 1 ou 10 mM ou d'acide valproïque à 0,6, 1 ou 2 mM pendant 1 heure. Les cellules utilisées comme témoin ont été mises en présence d'eau pendant 1 heure. Après les différents traitements, les cellules ont été lysées puis les protéines ont été déposées sur un gel SDS-PAGE et ont été soumises à un immunobuvardage de type Western. La PIMT a été immunodétectée ainsi que l' α -tubuline. L'analyse densitométrique de la PIMT est représentative de trois expériences individuelles et l'astérisque (*) identifie les valeurs de $p < 0,05$, pour le « Student Test », qui sont des valeurs considérées significativement différentes par rapport au témoin.

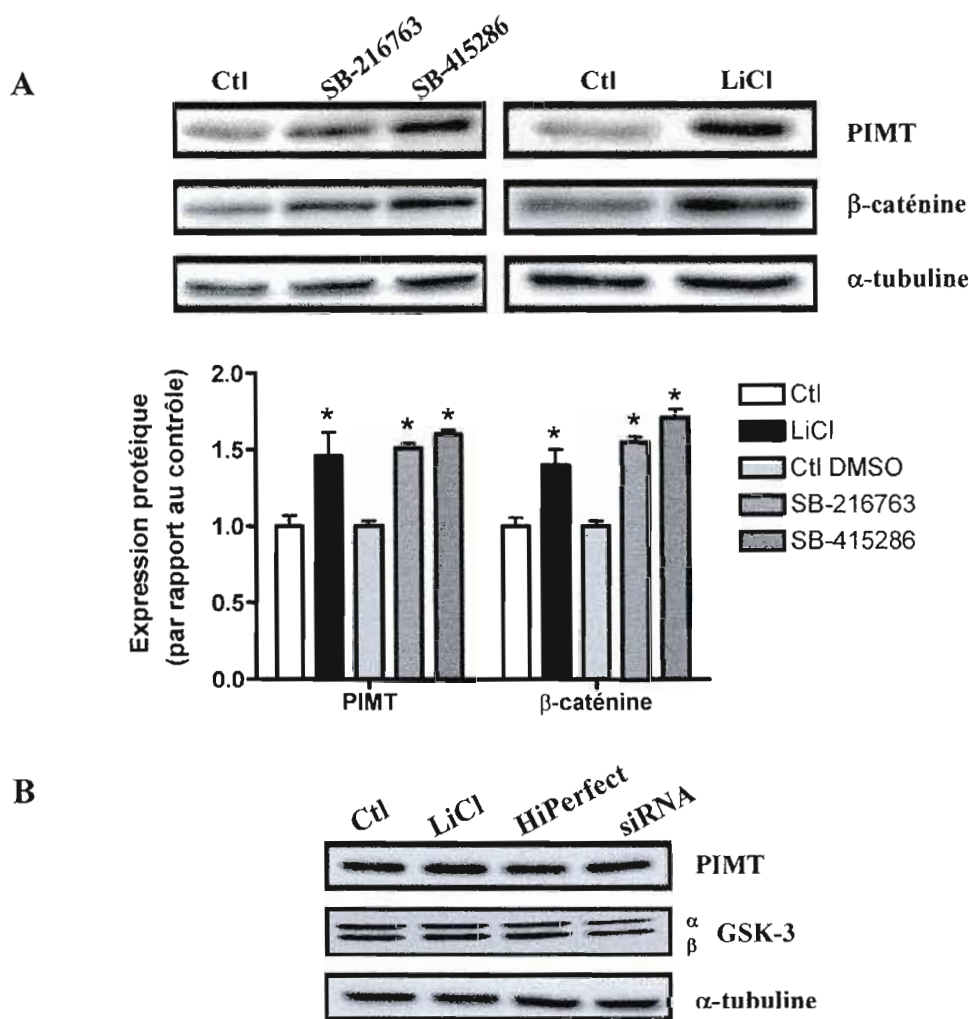


Figure 3.3 L'inhibition de GSK-3 stimule l'expression de la PIMT. (A) Les cellules U-87 ont été traitées avec des inhibiteurs pharmacologiques de GSK-3, soit le SB-216763 à 5 μ M et le SB-415286 à 30 μ M pendant 1 heure. Les cellules utilisées comme témoin ont été traitées avec du DMSO pendant 1 heure. Les cellules ont été traitées en parallèle avec du lithium à 10 mM pendant 1 heure et les cellules témoins avec de l'eau pendant 1 heure. (B) Les cellules U-87 ont été transfectées avec un siRNA contre les deux formes de GSK-3, α et β , à 50 nM pendant 48 heures. Les cellules utilisées comme témoins ont été mises en présence de l'agent transfectant (HiPerfect) seul, pendant 48 heures. D'autres cellules U-87 ont été traitées avec du lithium à 10 mM pendant 1 heure. Après les différents traitements, les cellules ont été lysées puis les protéines ont été déposées sur un gel SDS-PAGE et ont été soumises à un immunobuvardage de type Western. Les protéines qui ont été immunodétectées sont la PIMT, la β -caténine, les formes α et β de GSK-3 ainsi que l' α -tubuline. L'analyse densitométrique de la PIMT et de la β -caténine lors du traitement avec les inhibiteurs pharmacologiques est représentative de trois expériences individuelles et l'astérisque (*) identifie les valeurs de $p < 0,05$, pour le « Student Test », qui sont des valeurs considérées significativement différentes par rapport au témoin. Les résultats du siRNA sont représentatifs d'une seule expérience.

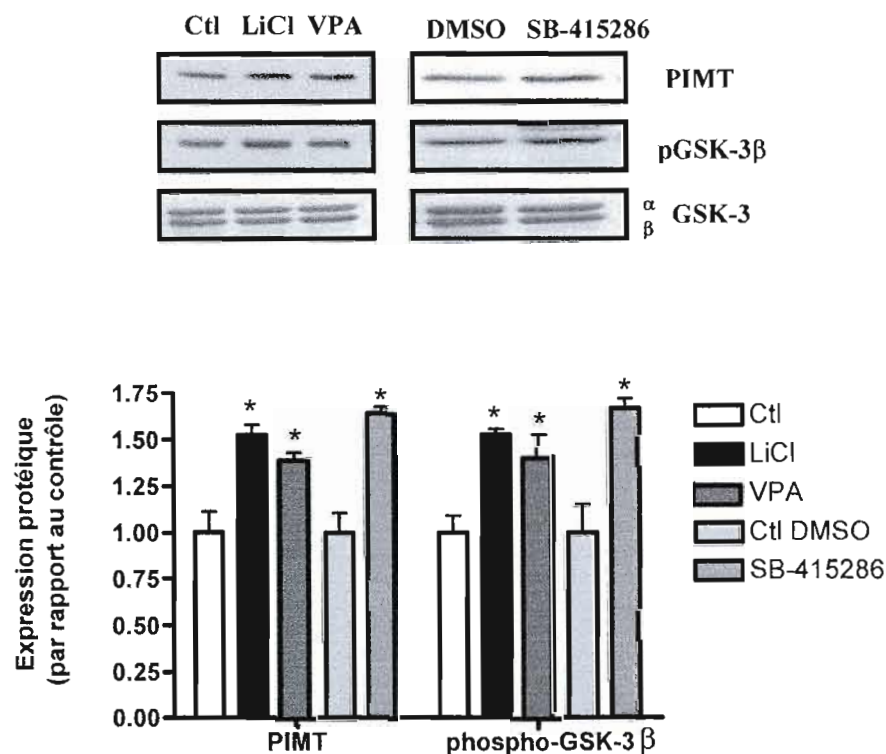


Figure 3.4 La phosphorylation de GSK-3 sur la serine 9 est associée à l'augmentation de l'expression de la PIMT. Les cellules U-87 ont été traitées avec les inhibiteurs de GSK-3 soit le lithium à 10 mM, l'acide valproïque à 2 mM et le SB-415286 à 30 μ M pendant 1 heure. Les cellules utilisées comme témoins ont été mises en présence d'eau ou de DMSO pendant 1 heure. Après les différents traitements, les cellules ont été lysées puis les protéines ont été déposées sur un gel SDS-PAGE et ont été soumises à un immunobuvardage de type Western. Les protéines qui ont été immunodétectées sont la PIMT, la forme phosphorylée de GSK-3 β (pGSK-3 β) ainsi que GSK-3 α et β qui a servi de contrôle pour s'assurer d'une quantité de protéines constante dans chaque puits. L'analyse densitométrique de la PIMT et de pGSK-3 β est représentative de trois expériences individuelles et l'astérisque (*) identifie les valeurs de $p < 0,05$, pour le « Student Test », qui sont des valeurs considérées significativement différentes par rapport au témoin.

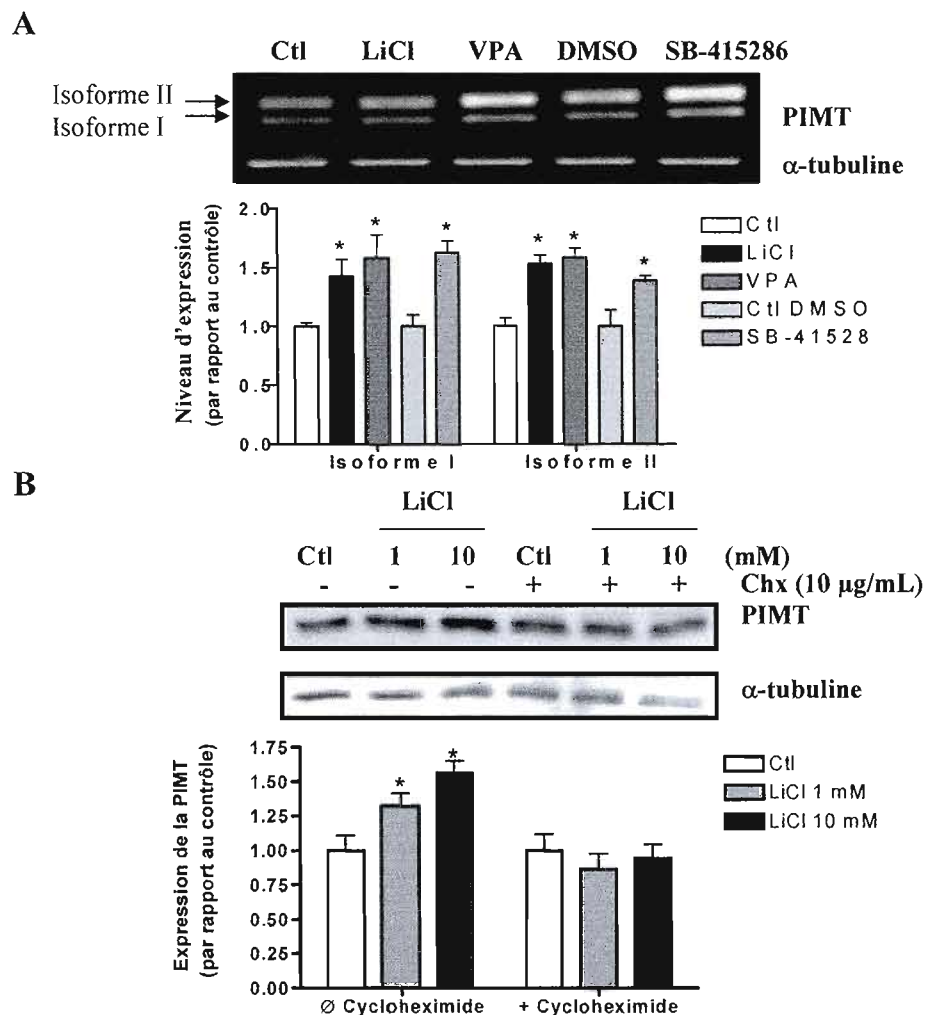


Figure 3.5 L'augmentation de l'expression de la PIMT par les inhibiteurs de GSK-3 est associée avec une quantité accrue de son ARNm et une augmentation de sa synthèse. (A) Les cellules U-87 ont été traitées avec les différents inhibiteurs de GSK-3 : le lithium à 10 mM, l'acide valproïque à 2 mM ou le SB-415286 à 30 μ M, pendant 1 heure. Les cellules utilisées comme témoins ont été mises en présence d'eau ou de DMSO, pendant 1 heure. Après les différents traitements, l'ARN des échantillons a été isolé et soumis à un RT-PCR avec les amorces spécifiques pour les deux isoformes de la PIMT ou avec les amorces pour l' α -tubuline. Les ADNc ont été colorés avec le bromure d'éthidium après leur séparation sur gels d'agarose 1,8%. **(B)** Les cellules U-87 ont été traitées avec du lithium à 1 ou 10 mM pendant 1 heure avec ou sans un pré-traitement d'une heure avec de la cycloheximide (Chx) à 10 μ g/mL. Les cellules utilisées comme témoins ont été mises en présence d'eau pendant 1 heure avec ou sans le pré-traitement à la cycloheximide. Après les traitements, les cellules ont été lysées puis les protéines ont été déposées sur un gel SDS-PAGE et ont été soumises à un immunobuvardage de type Western. Les protéines qui ont été immunodétectées sont la PIMT et l' α -tubuline. Ces résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences et l'astérisque (*) identifie les valeurs de $p < 0,05$, pour le « *Student Test* », qui sont des valeurs considérées significativement différentes par rapport au témoin.

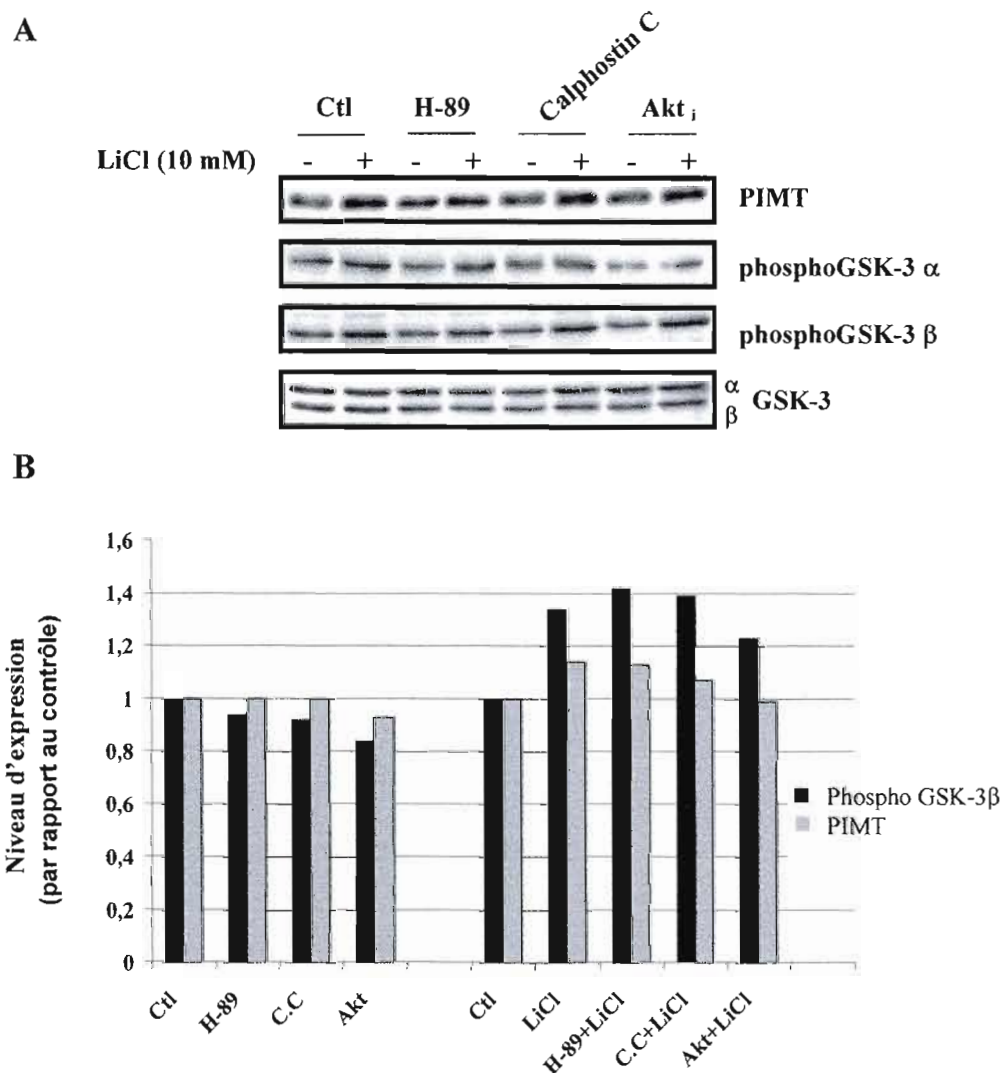


Figure 3.6 Les voies de PKA, PKC et Akt, impliquant GSK-3, ne semblent pas influencer l'expression de la PIMT. (A) Les cellules U-87 ont été traitées avec différents inhibiteurs de protéines kinases dont le H-89 (PKA) à 48 nM, le Calphostin C (PKC) à 50 nM et l'inhibiteur d'Akt (PKB) à 1 μ M. Les traitements ont été effectués en présence et en absence de lithium à 10 mM, pendant 1 heure. Après les différents traitements, les cellules ont été lysées et les protéines ont été déposées sur gels SDS-PAGE et ont été soumises à un immunobuvardage de type Western. Les protéines qui ont été immunodétectées sont la PIMT, les formes phosphorylées de GSK-3 α et β ainsi que GSK-3 α et β qui a servi de contrôle pour s'assurer d'une quantité de protéines constante dans chaque puits. (B) Les niveaux d'expression de la PIMT et de phosphoGSK-3 β ont été mesurés par densitométrie. La forme phosphorylée de GSK-3 α n'a pas été mesurée par densitométrie car elle n'a été détectée qu'une seule fois. Les autres résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences distinctes.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

La PIMT est une enzyme de réparation des protéines endommagées au niveau des résidus aspartates. Au cours des dernières années, de nombreuses études ont été effectuées afin de mieux caractériser ses rôles physiologiques. Un fait important ressort de toutes ces études : la PIMT joue un rôle crucial dans le bon fonctionnement du cerveau. Or, bien que nous comprenions mieux son rôle dans la cellule, les voies de signalisation impliquées dans la régulation de cette protéine demeurent toujours inconnues. Dans notre étude, nous nous sommes attardés sur le lien qui pouvait exister entre la PIMT et GSK-3, une kinase impliquée dans de nombreux processus intracellulaires et qui possède aussi un rôle très important dans le cerveau.

Ainsi, un traitement de cellules gliales (U-87) avec une dose thérapeutique de lithium, soit 1 mM, a permis de constater une augmentation croissante de l'expression de la PIMT en fonction du temps. Cette augmentation est majeure lorsque les cellules sont en présence de lithium pendant 48 heures. Or, la dose de lithium utilisée est reconnue pour n'inhiber que partiellement la protéine GSK-3. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle, selon certains chercheurs, le traitement au lithium doit être un traitement chronique et qu'il ne donne des résultats qu'après quelques jours de traitement (Jope, 2003). Dans notre cas, c'est peut-être ce qui peut expliquer l'augmentation majeure de l'expression de la PIMT après un traitement des cellules de 48 heures. Ainsi, le lithium peut inhiber directement GSK-3 par compétition avec le magnésium, mais ce serait rapide et l'augmentation de la PIMT serait maximale bien avant 48 heures. D'un autre côté, le lithium peut également empêcher la déphosphorylation de GSK-3 en inhibant certaines phosphatases. Ce processus est généralement plus long, ce qui pourrait expliquer l'augmentation majeure après 48 heures. Après cette période, nous avons constaté que l'effet du lithium sur l'expression de la PIMT diminuait. Ceci pourrait être associé à une plus faible concentration de lithium dans les cellules, dû au temps d'incubation de 3 jours ou encore s'expliquer par le fait que les cellules, à ce stade, ont atteint un très haut niveau de confluence, ce qui pourrait masquer l'effet du lithium sur l'expression de la PIMT. Par ailleurs, l' IC_{50} du lithium envers GSK-3 est de 2 mM, ce qui est deux fois plus élevé que

la dose utilisée lors de la cinétique. Comme l'objectif premier de cette étude est d'identifier les voies de signalisation impliquant la PIMT, nous avons décidé d'effectuer les traitements subséquents avec une dose de 10 mM, pendant une heure, afin d'obtenir une meilleure inhibition de GSK-3 et d'étudier l'effet de cette inhibition sur l'expression de la PIMT. C'est une dose beaucoup plus élevée que l' IC_{50} mais qui permet d'atteindre un plus haut degré d'inhibition de la protéine GSK-3. Par ailleurs, des études ont déjà utilisé des doses allant jusqu'à 20 mM de lithium afin d'étudier l'inhibition de GSK-3 sans remarquer d'effet nocif sur les cellules (Zhang *et al*, 2003). Cette même étude démontrait qu'à cette concentration de lithium, une augmentation marquée de la phosphorylation de GSK-3 β se produisait dans un délai de cinq minutes et augmentait en fonction du temps. De plus, comme nous avons observé qu'un traitement des cellules avec 10 mM de NaCl pendant une heure n'affectait pas l'expression de la PIMT de manière significative (figure 3B), et que l'augmentation de l'expression de la PIMT était bien attribuable au lithium, nous n'avons pas jugé nécessaire de répéter ce contrôle dans les expériences subséquentes. Un autre fait important qui a été observé est l'augmentation de l'expression de la PIMT en fonction de la confluence des cellules. C'est un résultat sur lequel nous ne nous sommes pas attardés dans le cadre de cette étude, mais qui mériterait d'être approfondi. Cela permet de suggérer que la PIMT pourrait être régulée par l'adhérence et/ou l'interaction cellulaire et d'ouvrir de nouvelles hypothèses sur l'implication de la PIMT, dans le cancer notamment.

Par ailleurs, comme le lithium n'agit pas spécifiquement sur GSK-3 dans la cellule, mais qu'il peut également intervenir dans la voie de l'inositol, en inhibant deux enzymes importantes pour sa synthèse, nous avons donc tenté de déterminer laquelle des deux cibles influençait l'expression de la PIMT. Or, le traitement des cellules avec le myo-inositol en présence ou en absence de lithium n'a démontré aucun effet majeur sur le niveau d'expression de la PIMT, ce qui éliminait l'hypothèse d'une régulation de la PIMT par l'inositol. Nous avons donc par la suite utilisé l'acide valproïque pour vérifier si l'effet de l'inhibition de GSK-3 était vraiment attribuable à une augmentation de l'expression de la PIMT. L'acide valproïque est un agent anti-convulsant, utilisé aujourd'hui pour traiter les cas de désordres bipolaires, comme le lithium. Ainsi, bien que leurs mécanismes d'action diffèrent, ces deux agents ont comme cible commune la protéine GSK-3. Par ailleurs, il a été rapporté qu'une dose thérapeutique de 0,6 mM de VPA pouvait inhiber jusqu'à 54% de l'activité de l'isoforme α de la protéine GSK-3 et

jusqu'à 86% de l'isoforme β , dans des neuroblastomes SH-SY5Y (Chen *et al*, 2000). Toutefois, ces résultats peuvent varier selon le type cellulaire. Néanmoins, le traitement des cellules U-87 avec différentes doses d'acide valproïque a, tout comme le lithium, démontré une augmentation de l'expression de la PIMT. Ces résultats suggèrent donc une corrélation entre l'inhibition de la protéine GSK-3, puis une stimulation de l'expression de la PIMT et, de ce fait, un rôle probable de la PIMT dans les désordres bipolaires. Un fait intéressant en ce qui concerne l'acide valproïque est qu'il est également utilisé comme traitement pour l'épilepsie. Or, il a déjà été démontré que les cerveaux atteints d'épilepsie expriment moins la PIMT (Lanthier *et al*, 2002). De ce fait, il serait intéressant de vérifier si l'expression de la PIMT, dans les cerveaux de patients atteints d'épilepsie, se trouve augmentée lors du traitement avec l'acide valproïque et si cela permet la réparation de protéines endommagées. Il serait également intéressant de vérifier l'expression de la PIMT et/ou la présence de protéines endommagées sur les résidus aspartates dans des cerveaux atteints de désordres bipolaires. Comme les deux principaux agents utilisés pour le traitement de cette maladie permettent l'augmentation de la PIMT, il serait intéressant de vérifier si cette protéine n'a pas un rôle à jouer dans cette pathologie.

Bien que le lithium et l'acide valproïque soient efficaces pour inhiber la protéine GSK-3, il n'en demeure pas moins que ce ne sont pas des inhibiteurs spécifiques à cette kinase. C'est pour cette raison que nous avons procédé à un traitement des cellules avec le SB-216763 et le SB-415286. Ce sont deux inhibiteurs hautement spécifiques à GSK-3. En effet, une étude a été effectuée sur un groupe de 24 protéines kinases semblables à GSK-3, et aucun de ces inhibiteurs ne démontrait une activité envers l'une des ces protéines (Cross *et al*, 2001). Les résultats obtenus lors du traitement des cellules avec ces deux inhibiteurs démontrent une augmentation de l'expression de la PIMT, qui est semblable à celle obtenue en présence de lithium. Toutefois, il a été rapporté que ces inhibiteurs pouvaient également avoir comme cible la *cyclin-dependent kinase-1* (CDK-1) (Meijer, Flajolet et Greengard, 2004). Cependant, un traitement des cellules U-87 avec la roscovitine, un inhibiteur de CDK-1 qui n'agit pas sur GSK-3, n'a démontré aucune modulation de l'expression de la PIMT (résultat non montré) et ce même avec des doses 10 fois plus élevées que l' IC_{50} . Ces résultats ont donc permis de confirmer que la PIMT est régulée par GSK-3. En parallèle, il a été rapporté que le lithium agit sur GSK-3, principalement au niveau de la voie de Wnt. Or, une inhibition de GSK-3 dans cette voie

permet à la β -caténine de s'accumuler dans la cellule et, éventuellement, d'être transférée au noyau où elle peut activer la transcription de certains gènes. Nous avons donc vérifié l'expression de cette protéine lors du traitement des cellules avec le lithium et les deux inhibiteurs spécifiques et nous avons effectivement constaté une augmentation du niveau d'expression de la β -caténine. Ce résultat est pertinent, car la β -caténine, lorsqu'elle migre au noyau, permet l'activation de certains facteurs de transcription. Il serait donc intéressant de vérifier si le gène de la PIMT est l'une des cibles de l'activation de la transcription par la β -caténine, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de son expression suite à l'inhibition de GSK-3.

Nous avons également tenté d'inhiber GSK-3 en utilisant un siRNA dirigé contre les deux isoformes de cette protéine. Cependant, les résultats obtenus ne sont pas très satisfaisants. En effet, l'inhibition de GSK-3 après un traitement de 48 heures avec le siRNA ne s'est pas révélée aussi efficace que nous pouvions nous y attendre. Ceci peut être dû à une mauvaise transfection des cellules, un effet que nous aurions pu vérifier par fluorescence. Il se peut également que la protéine GSK-3 possède une longue demi-vie et que le traitement de 48 heures avec une seule dose de siRNA ne soit pas suffisant pour inhiber adéquatement la protéine dans ce type cellulaire. Cependant, un point positif est que l'expression de la PIMT semble tout de même augmentée, même en présence d'une faible inhibition de GSK-3, ce qui va dans le même sens que les résultats précédents et qui confirme que la PIMT peut être régulée par GSK-3 dans les glioblastomes.

Nous avons par la suite étudié le rôle de la phosphorylation de GSK-3 sur l'expression de la PIMT. Nous avons constaté que l'augmentation de l'expression de la PIMT est associée à une augmentation de la phosphorylation de la sérine 9 de GSK-3 β lorsque cette dernière est inhibée par le lithium, l'acide valproïque ou le SB-415286. Ce qu'il serait intéressant d'identifier, c'est si la phosphorylation de GSK-3 par les différents inhibiteurs est une conséquence directe ou si les inhibiteurs utilisés contre GSK-3 n'agissent pas plutôt en inhibant une phosphatase qui permet la déphosphorylation de GSK-3. D'ailleurs, des études ont déjà démontré que le lithium pouvait inhiber la phosphatase PP2A ainsi que la phosphatase PP1, cette dernière pouvant être impliquée dans la déphosphorylation de GSK-3 (Chen *et al*, 2006; Zhang *et al*, 2003). Il serait donc intéressant de tenter d'identifier si l'une de ces phosphatases est

responsable de la déphosphorylation de GSK-3 et vérifier l'effet de leur inhibition sur l'expression de la PIMT.

Par la suite, puisque les résultats démontrent clairement que la protéine GSK-3 peut réguler l'expression de la PIMT, du moins son inhibition, nous avons donc décidé d'analyser à quel niveau se faisait cette régulation. Nous avons donc procédé à l'analyse par RT-PCR du niveau d'expression de l'ARNm de la PIMT lorsque les cellules sont traitées avec les différents inhibiteurs. Les résultats montrent clairement une augmentation du niveau d'expression de l'ARNm de la PIMT. À partir de ces résultats, il serait pertinent de déterminer si cette augmentation est associée à une transcription accrue du gène de la PIMT, qui pourrait être amorcée par la translocation de la β -caténine au noyau, ou à une plus grande stabilité de l'ARNm de la PIMT. Cette dernière hypothèse peut s'avérer juste, car une étude récente a rapporté que l'inhibition de GSK-3 β par le SB-415286 permettait d'obtenir une stabilité accrue de l'ARNm de la cyclooxygénase-2 (Thiel et al, 2006). Nous pourrions donc vérifier ce paramètre en effectuant le même traitement des cellules avec les inhibiteurs, mais en ajoutant de l'actinomycine D, un agent qui peut s'intercaler dans l'ADN et empêcher la synthèse de l'ARN. Par la suite, il suffirait de vérifier l'expression de l'ARNm par RT-PCR en temps réel. De plus, nous avons également vérifié ce qui se passait au niveau de la synthèse de la PIMT. En utilisant la cycloheximide, nous avons pu constater que cela empêchait la stimulation de l'expression de la PIMT provoquée par le lithium. Ceci suggère donc que, non seulement la PIMT est régulée au niveau de son ARNm par l'inhibition de GSK-3, mais qu'elle l'est également au niveau de sa synthèse, peut-être par l'intermédiaire d'eIF2B, un facteur impliqué dans l'initiation de la traduction des protéines, connu pour être l'un des substrats de GSK-3. Si GSK-3 est inhibée, alors eIF2B n'est plus phosphorylé et peut alors être actif dans la cellule.

Puisque le but de notre étude est de caractériser les voies de signalisation de la PIMT, nous avons donc tenté de savoir si l'une des voies qui implique GSK-3 pouvait modifier l'expression de la PIMT. Les voies de PKA, PKC et PKB sont quelques-unes des voies de signalisation qui, lorsqu'elles sont actives dans la cellule, permettent l'inhibition de GSK-3. Puisque nous avons précédemment établi que l'inhibition de GSK-3 stimule l'expression de la PIMT, nous voulions savoir si l'activation de cette dernière pouvait aussi avoir une influence sur l'expression de la PIMT. Donc, en inhibant les protéines

PKA, PKC et Akt, nous serions en mesure de constater une plus faible phosphorylation de GSK-3 et, par conséquent, peut-être voir une chute de l'expression de la PIMT. Or, les résultats obtenus avec les inhibiteurs de PKA et PKC ne sont pas ceux qui étaient attendus. Nous avons effectivement observé une diminution de la phosphorylation de GSK-3, mais ce n'est rien de très prononcé. Par ailleurs, le niveau d'expression de la PIMT ne varie pas tellement en présence de cette faible activation de GSK-3. Les traitements pourraient être effectués à des doses d'inhibiteurs supérieures à celles utilisées afin de bien inhiber les cibles identifiées. De plus, des contrôles démontrant l'expression de PKA, PKC et Akt devraient être effectués afin de s'assurer de l'inhibition de ces kinases lors des différents traitements. Ceci permettrait une analyse plus adéquate de l'expression de GSK-3 et de la PIMT dans ces conditions. Il est tout de même possible d'observer que l'inhibition de Akt réduit sensiblement la phosphorylation de GSK-3 et ceci semble prévenir l'induction de la PIMT en présence de lithium. Ces résultats suggèrent que Akt pourrait être impliquée dans la régulation de la PIMT. Le traitement pourrait être refait avec des doses plus élevées d'inhibiteur ou encore à des doses inférieures si des concentrations élevées s'avèrent cytotoxiques. D'autre part, nous pourrions utiliser des agents connus pour activer ces kinases comme l'adénosine monophosphate cyclique pour la PKA, l'insuline pour Akt et le diacylglycérol pour PKC, et ainsi permettre une inhibition de GSK-3 par l'intermédiaire de ces voies de signalisation. Ensuite, nous vérifierions l'expression de la PIMT dans les cellules traitées avec ces agents. Cela permettrait peut-être d'identifier une piste pour la régulation de la PIMT, en amont de GSK-3.

Les résultats obtenus au cours de cette étude permettent donc d'établir un lien concret entre la protéine GSK-3 et la PIMT. Il ne fait aucun doute que l'inhibition de GSK-3 permet la régulation de la PIMT. En perspective, il serait intéressant d'utiliser un mutant de GSK-3, muté sur la sérine 9 et/ou 21 afin de confirmer la contribution de la phosphorylation de GSK-3 dans la régulation de la PIMT. Il reste également à démontrer si une surexpression de GSK-3 dans la cellule induit une inhibition de la PIMT. Si tel est le cas, l'étude deviendrait intéressante dans des cas d'Alzheimer. Dans cette pathologie, il a été rapporté que l'activité de GSK-3 est augmentée (Kosuga *et al*, 2005) et que de nombreuses protéines portent de résidus aspartates anormaux (Shimizu, Matsuoka et Shirasawa, 2005). Il pourrait donc y avoir un lien entre ces deux protéines dans cette maladie. De plus, un paramètre qui n'a pas encore été analysé est l'activité de la PIMT

lorsque les cellules sont traitées avec les inhibiteurs de GSK-3. Il serait intéressant de vérifier si l'activité de cette protéine augmente de la même manière que son niveau d'expression. Si l'activité de la PIMT augmente en présence de lithium, il serait intéressant de faire un rapprochement avec les désordres bipolaires et de vérifier l'activité de la PIMT dans cette maladie. Cela pourrait peut-être impliquer une plus grande quantité de protéines endommagées dans les désordres bipolaires, d'où l'implication de la PIMT dans cette maladie.

CONCLUSION

La protéine L-isoaspartate (D-aspartate) méthyltransférase est une enzyme de réparation des protéines endommagées qui, comme son nom l'indique, permet le transfert d'un groupement méthyle sur un résidu L-isoaspartate. Au cours du vieillissement, les protéines ont tendance à accumuler davantage de tels dommages, de sorte que le rôle de la PIMT croît avec le temps. Par ailleurs, de nombreuses études ont démontré l'implication de cette protéine dans plusieurs maladies neurologiques et ont ainsi illustré l'importance de cette protéine dans la cellule. Il devient donc essentiel d'identifier les voies de signalisation qui régissent les fonctions de cette protéine. À cet effet, notre étude a permis d'établir un lien entre la kinase GSK-3 et la PIMT. En effet, nous avons démontré que l'inhibition de la protéine GSK-3 avec une dose thérapeutique de lithium, de l'acide valproïque et des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques à GSK-3, permet une augmentation de l'expression de la PIMT, que cette augmentation est corrélée à la phosphorylation de GSK-3 et que la régulation se fait aussi bien au niveau de l'ARNm que de la synthèse protéique. Il reste encore beaucoup de travail afin de mieux caractériser cette régulation de la PIMT par GSK-3. Toutefois, cette nouvelle voie de signalisation pour la PIMT ouvre la porte à de nombreuses nouvelles hypothèses, à savoir si la PIMT est impliquée dans les désordres bipolaires ou encore s'il existe un lien entre GSK-3 et la PIMT dans la maladie d'Alzheimer. Cette étude a donc permis d'établir un lien entre deux protéines qui étaient, jusqu'à maintenant, connues pour leurs implications importantes dans la cellule, mais qui étaient alors considérées comme deux entités indépendantes.

BIBLIOGRAPHIE

- Aberle, H., A. Bauer, J. Stappert, A. Kispert et R. Kemler. 1997. « β -Catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway ». *EMBO J.*, vol. 16, p. 3797-3804.
- Aswad, D.W. (éd) 1995. « Deamidation and isoaspartate formation in peptides and proteins » Chap. In *Purification and properties of protein L-isoaspartyl methyltransferase*, p.31-46. Boca raton (FL): CRC Press.
- Aswad, D.W., M.V. Parandhi et B.T. Schurter. 2000. « Isoaspartate in peptides and proteins: formation, significance and analysis ». *J.Pharm.Biomed.Anal.*, vol. 21, p. 1129-1136.
- Axelrod, J. et J. Daly. 1965. « Pituitary gland: enzymatic formation of methanol from S-adenosylmethionine ». *Science*, vol. 150, p.892-893.
- Barten D.M. et R.F. O'Dea. 1990. « The function of protein carboxylmethyltransferase in eucaryotic cells ». *Life Sci.*, vol. 47, p. 181-194.
- Boivin, D., D. Bilodeau et R. Béliveau. 1995. « Immunochemical characterization of L-isoaspartyl-protein carboxyl methyltransferase from mammalian tissues » *Biochem. J.* vol.261, p.993-998.
- Boivin, D., D. Gingras et R. Béliveau. 1993. « Purification and characterization of a membrane-bound protein carboxyl methyltransferase from rat kidney cortex ». *J.Biol.Chem.*, vol. 268, p. 2610-2615.
- Cao, Q., X. Lu et Y.J. Feng. 2006. « Glycogen synthase kinase-3 β positively regulates the proliferation of the human ovarian cancer cells ». *Cell Res.*, vol. 16, p. 671-677.
- Chen, C.L., C.F. Lin, C.W. Chiang, M.S. Jan et Y.S. Lin. 2006. « Lithium inhibits ceramide- and etoposide-induced PP2A methylation, Bcl-2 dephosphorylation, Caspase-2 activation and apoptosis ». *Mol. Pharmacol.*, vol. 70, p. 510-517.
- Chen, G., L.D. Huang, Y.M. Jiang, H.K. Manji. 1999. « The mood-stabilizing agent valproate inhibits the activity of glycogen synthase kinase-3 ». *J. Neurochem.*, vol. 72, p. 1327-1330.
- Clarke, S. 2003. « Aging as war between chemical and biochemical processes: Protein methylation and the recognition of age-damaged proteins for repair ». *Ageing Res. Rev.*, vol. 2, p. 263-285.
- Cohen, P. et S. Frame. 2001. « The renaissance of GSK-3 ». *Na. Rev. Mol. Cell. Biol.*, vol. 2, p.769-776.
- Cross, D.A., A.A. Culbert, K.A. Chalmers, L. Facci, S.D. Skaper et A.D. Reith. 1995. « Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B ». *Nature*, vol. 378, p.785-789.

- Cross, D.A., A.A. Culbert, K.A. Chalmers, L. Facci, S.D. Skaper et A.D. Reith. 2001. « Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death ». *J. Neurochem.*, vol. 77, p.94-102.
- Dajani, R., E. Fraser, S.M. Roe, N. Young, V. Good, T.C. Dale et L.H. Pearl. 2001. « Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition ». *Cell*, vol. 105, p.721-732.
- DeVry, C.G. et S. Clarke. 1999. « Polymorphism forms of protein L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase involved in the repair of age-damaged proteins ». *J. Hum. Genet.*, vol. 44, p.275-288.
- Diehl, A.J., M. Cheng, M.F. Roussel et C.J. Sherr. 2003. « Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization ». *Genes Dev.*, vol. 12, p.3499-3511
- Diliberto, E.J., Jr. et J. Axelrod. 1974. « Characterization and substrate specificity of a protein carboxymethylase in the pituitary gland ». *J.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, vol. 71, p. 1701-1704.
- Ding, V.W., R.H. Chen et F. McCormick. 2000. « Differential regulation of glycogen synthase kinase 3 β by insulin and Wnt signalling ». *J. Biol. Chem.*, vol. 275, p.32475-32481.
- Doble, B.W. et J.R. Woodgett. 2003. « GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase ». *J. Cell Sci.*, vol 116, p. 1175-1186.
- Frame, S. et P. Cohen. 2001. « GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery ». *Biochem. J.*, vol. 359, p. 1-16.
- Gingras, D., P. Ménard et R. Béliveau. 1991. « Protein carboxyl methylation in kidney brush border membranes ». *Biochim. Biophys. Acta.*, vol. 1066, p.261-267.
- Gregory, M.A., Y. Qi et S.R. Hann. 2003. « Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-Myc proteolysis and subnuclear localization ». *J. Biol. Chem.*, vol.278, p. 51606-51612.
- Harwood, A.J. et G. Agam. 2003. « Search for a common mechanism of mood stabilizers ». *Biochem. Pharmacol.*, vol. 66, p. 179-189.
- Hoeflich, K.P., J. Luo, E.A. Rubie, M.S. Tsao, O. Jin et J.R. Woodgett. « Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF-kappaB activation ». *Nature*, vol. 406, p. 86-90.
- Hong, M., D.C.R. Chen, P.S. Klein et V.M.Y. Lee. 1997. « Lithium reduces Tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3 ». *J. Biol. Chem.*, vol. 272, p. 25326-25332.

- Huebscher, K.J., J. Lee, G. Rovelli, B. Ludin, A. Matus, D. Stauffer et P. Fürst. 1999. « Protein isoaspartyl methyltransferase protects from Bax-induced apoptosis ». *Gene*, vol. 240, p. 333-341.
- Johnson, B.A., E.L. Langmack et D.W. Aswad. 1987. « Partial repair of deamidated-damaged calmodulin by protein carboxyl methyltransferases ». *J.Biol.Chem.*, vol. 262, p.12283-12287.
- Jope, R.S. 2003. « Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes ». *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 24, p. 441-443.
- Kaidanovich, O. et H. Eldar-Frinkelman. 2002. « The role of glycogen synthase kinase-3 in the insuline resistance and type 2 diabetes ». *Expert Opin Ther Targets*, vol.6, p.555-561
- Kim, S. 1973. « Purification and properties of protein methylase II ». *Archs Biochem. Biophys.*, vol. 157, p.476-484.
- Kim, S., J. Choi et G.J. Jun. 1983. « Purification and characterization of protein methylase II from human erythrocytes ». *J. Biochem. Biophys. Meth.*, vol. 8, p.9-14.
- Kim, S. et W.K. Paik. 1970. « Purification and properties of protein methylase II ». *J. Biol.Chem.*, vol. 245, p. 1806-1813.
- Kosuga, S., E. Tashiro, T. Kajioka, M. Ueki, Y. Shimizu et M. Imoto. 2005. « GSK-3 β directly phosphorylates and activates MARK2/PAR-1 ». *J. Biol. Chem.*, vol. 280, p. 42715-42722.
- Kruman, I.I., T.S. Kumaravel, A. Lohani, W.A. Pedersen, R.G. Cutler, Y. Kruman, N. Haughey, J. Lee, M. Evans et M.P. Mattson. 2002. « Folic acid deficiency and hyperhomocysteinemia impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease ». *J. Neurosci.*, vol. 22, p. 1752-1762.
- Laemmli, U.K. 1970. « Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 ». *Nature*, vol. 227, p.680-685.
- Lanthier, J., A. Bouthillier, M. Lapointe, M. Demeule, R. Béliveau et R.R Desrosiers. 2002. « Down-regulation of protein L-isoaspartyl methyltransferase in human epileptic hippocampus contributes to generation of damaged tubulin ». *J. Neurochem.*, vol. 83, p. 581-591.
- Lanthier, J. et R.R. Desrosiers. 2004. « Protein L-isoaspartyl methyltransferase repairs abnormal aspartyl residues accumulated in vivo in type-I collagen and restores cell migration ». *Exp. Cell Res.*, vol. 293, p.96-105.
- Lapointe, M., J. Lanthier, R. Moumdjian, A. Régina et R.R Desrosiers. 2005. « Expression and activity of L-isoaspartyl methyltransferase decrease in stage progression of human astrocytic tumors ». *Brain Res Mol Brain Res.*, vol. 135, p. 93-103.

- Liss, M. et L.M. Edelstein. 1967 « Evidence for the enzymatic methylation of crystalline ovalbumin preparations ». *Biochem Biophys Res Commun.*, vol. 26, p. 497-504.
- Liss, M., A.M. Macam et L.J. Cuprak. 1969 « Methylation of protein by calf spleen methylase. A new protein methylation reaction ». *J. Biol. Chem.*, vol. 244, p. 1617-1622.
- Lowenson, J.D. et S. Clarke. 1992. « Recognition of d-aspartyl residues in polypeptides by erythrocyte L-isoaspartyl/D-aspartyl protein methyltransferase, Implications for the repair hypothesis ». *J. Biol. Chem.*, vol. 267, p. 5985-5995.
- Lowenson, J.D., E. Kim, S.G. Young et S. Clarke. 2001. « Limited accumulation of damaged proteins in L-isoaspartyl (D-aspartyl) O-methyltransferase ». *J. Biol. Chem.*, vol. 276, p. 20695-20702.
- MacLaren, D.C., R.M. Kagan et S. Clarke. 1992. « Alternative splicing lead of the human isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase RNA leads to the generation of a C-terminal-RDEL sequence isozyme II ». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 185, p. 277-283.
- Meijer, L., M. Flajolet et P. Greengard. 2004. « Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3 ». *Trends pharmacol. sci.*, vol. 25, p. 471-480.
- Misra, U.K., R. Deedwania et S.V. Pizzo. 2006. « Activation and cross-talk between Aktm NF-kappaB, and unfolded protein response signalling in L-LN prostate cancer cells consequent to ligation of cell surface-associated GRP78 ». *J. Biol. Chem.*, vol. 281, p. 13694-13707.
- Murray, E.D., Jr. et S. Clarke. 1984. « Synthetic peptid substrates for the erythrocyte protein carboxyl methyltransferase. Detection of a new site of methylation at isomerized L-aspartyl residues ». *J. Biol. Chem.*, vol. 259, p. 10722-10732.
- Ougolkov, A.V., M.E. Fernandez-Zapico, D.N. Savoy, R.A. Urrutia et D.D. Billadeau. 2005. « Glycogen synthase kinase-3beta participates in nuclear factor kappaB mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cancer cells ». *Cancer Res.* vol. 65, p. 2076-2081.
- Pascale, R.M., M.M. Simile, M.R. De Miglio et F. Feo. 2002. « Chemoprevention of hepatocarcinogenesis : S-adenosyl-L-methionine ». *Alcohol*, vol. 27, p. 193-198.
- Plotkin, B., O. Kaidanovich, I. Tailor et H. Eldar-Frinkelman. 2003. « Mimetic insulin action of synthetic phosphorylated peptid inhibitors of glycogen synthase kinase-3 ». *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 305, p. 974-980.
- Potter, S.M., B.A. Johnson, A. Henschen. D.W. Aswad et A.W. Guzzetta. 1992. « The type II isoform of bovine brain protein L-isoaspartyl methyltransferase has an endoplasmic reticulum retention signal (...RDEL) at its C-terminus ». *Bochemestry.*, vol. 31, p. 6339-6347.

- Robinson, N.E et A.B. Robinson. 2004 « Amide molecular clocks in drosophila proteins : potential regulators of aging and other processes ». *Mech Ageing Dev.*, vol. 125, p. 259-267.
- Roher, A.E., J.D. Lowenson, S. Clarke, C. Wolkow, R. Wang, R.J. Cotter, I.M. Reardon, N.H. Zurcher, R.L. Heinrikson, M.J. Ball et R.D. Greenberg. 1993. « Structural alterations in the peptide backbone of beta-amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease ». *J. Biol. Chem.*, vol 268, p. 3072-3083.
- Sellinger, O.Z., C.M. Kramer, A. Conger et G.S. Duboff. 1988. «The carboxylmethylation of cerebral membrane-bound proteins increases with age ». *Mech Ageing Dev.*, vol. 43, p. 161-173.
- Shakoori, A., A. Ougolkov, Z.W. Yu, B. Zhang, M.H. Modarressi, D.D. Billadeau, M. Mai, Y. Takahashi et T. Minamoto. 2005. « Deregulated GSK3beta activity in colorectal cancer : its association with tumor cell survival and proliferation ». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 334, p. 1365-1373.
- Shimuzu, T., T. Ikegami, M. Ogawara, Y. Suzuki, m. Takahashi, H. Morio et T. Shirasawa. 2002. « Transgenic expression of protein L-isoaspartyl methyltransferase (PIMT) gene in the brain rescues mice from fatal epilepsy of PIMT deficiency ». *J. Neurosci. Res.*, vol. 69, p. 341-352.
- Shimuzu, T., Y. Matsuoka et T. Shirasawa. 2005. « Biological significance of isoaspartate and its repair system ». *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 28, p.1590-1596.
- Smalley, M.J. et T.C. Dale. 1999. « Wnt signalling in mammalian development and cancer ». *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 18, p. 215-230.
- Thiel A., M. Heinonen, J. Rintahaka, T. Hallikainen, A. Hemmes, D.A. Dixon, C. Haglung et A. Ristimäki. 2006. « Expression of cyclooxygenase-2 is regulated by glycogen synthase kinase-3b in gastric cancer cells ». *J. Biol. Chem.*, vol. 281, p. 4564-4569.
- Thomas, G.M., S. Frame, M. Goedert, I. Nathke, P. Polakis et P. Cohen. 1999. « A GSK3-binding peptide from FRAT1 selectively inhibits the GSK3-catalysed phosphorylation of axin and beta-catenin ». *FEBS Lett.*, vol. 458, p. 247-251.
- Tung, H.Y.L. et L.J. Reed. 1989. «Purification and characterization of protein phosphatase 1_i activating kinase from bovine brain cytosolic and particulate fractions ». *J. Biol. Chem.*, vol.264, p.2985-2990.
- Weintraud, S.J. et S.R. Manson. 2004. « Asparagine deamidation : a regulatory hourglass ». *Mech. Ageing Dev.*, vol. 125, p. 255-257.
- Williams R.S.B. et A.J. Harwood. 2000. « Lithium therapy and signal transduction ». *Trends Pharmacol Sci.*, vol. 21, p. 61-64.

- Woodgett, J.R.. 1990. « Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/Factor A ». *The EMBO Journal*, vol.9, p. 2431-2438.
- Woodgett, J.R.. 2001. « Judging a protein by more than its name: GSK-3 ». *Sci. STKE*, vol. 100, RE 12
- Wu, L.L. et J.T. Wu. 2002. « Hyperhomocysteinemia is a risk factor for cancer and a new potential tumor marker ». *Clin. Chim. Acta.*, vol. 322, p. 21-28.
- Xu, Q., M.P. Belcastro, S.T. Villa, R.D. Dinkins, S.G. Clarke et A.B. Downie. 2004 « A second protein L-isoaspartyl methyltransferase gene in Arabidopsis produces two transcripts whose products are sequestered in the nucleus ». *Plant Physiol.*, vol. 136, p. 2652-2664.
- Yamamoto, A., H. Takagi, D. Kitamura, H. Tatsuoka, H. Nakano, H. Kawano, H. Kuroyanagi, Y. Yahagi, S. Kobayashi, K. Koizumi, T. Sakai, K. Saito, T. Chiba, K. Kawamura, K. Suzuki, T. Watanabe, H. Mori et T. Shirasawa. 1998. « Deficiency in Protein L-isoaspartyl Methyltransferase results in a fatal progressive epilepsy ». *J. Neurosci.*, vol. 18, p. 2063-2074.
- Young, W.G., S.A Hoofring, M.J. Mamula, H.A Doyle, G.J. Bunick, Y. Hu et D.W. Aswad. 2005. « Protein L-Isoaspartyl Methyltransferase Catalyzes *in Vivo* Racemization of Aspartate-25 in Mammalian Histone H2B ». *J. Biol. Chem.*, vol. 280, p. 26094-26098.
- Zhang, F., C.J. Phiel, L. Spece, N. Gurvich et P.S. Klein. 2003. « Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in response to lithium ». *J. Biol. Chem.*, vol. 278, p.33067-33077.